

Etude sur les conditions de réintroduction des fongicides systémiques dans les programmes de lutte contre la Maladie des Raies Noires au Cameroun dans la zone de production de la banane dessert d'exportation

**CONTRAT DE SERVICES N° 146 -762/786/798/801 (CRIs)**

**Assistance Technique et Financière (2000, 2001, 2002 et 2005) à la filière bananière camerounaise d'exportation**

**Rapport narratif final – décembre 2010**

**Luc de Lapeyre de Bellaire , Josué Essoh Ngando, Adrien Rieux, Jean Carlier, Virginie Ravigné, Marie Françoise Zapater, *Françoise Careel***

avec la collaboration technique **de F. Tchipe, J. Essome, S. Kana, C. Essoh et H. Mpouli, Robert Dongmo, Oscar Nguidjo, Luc Pignolet**

**CARBAP – BP 832 – Douala Cameroun**

**Njombé, décembre 2010**



**Document CARBAP 21/CARBAP/2010**



## 1. Description

---

**1.1. Nom du bénéficiaire du contrat de subvention:**

Centre Africain de Recherches sur bananiers et Plantains (CARBAP)

**1.2. Nom et fonction de la personne de contact :**

Kodjo Tomekpe, Directeur du centre

**1.3. Nom des partenaires de l'Action:**

CIRAD (Centre International de Recherches Agronomiques pour le Développement) et Bayer CropScience

**1.4. Intitulé de l'Action:**

Etude sur les conditions de réintroduction des fongicides systémiques dans les programmes de lutte contre la Maladie des Raies Noires au Cameroun

**1.5. Numéro du contrat:**

N° 146 – 762/786/798/801 (Cris)

**1.6. Date de début et date de fin de la période de reporting:**

1<sup>er</sup> avril 2009 au 15 septembre 2009

**1.7. Pays ou région(s) cible(s):**

Cameroun

**1.8. Bénéficiaires finaux et/ou groupes cibles<sup>1</sup> (si différents) (y inclus le nombre de femmes et d'hommes):**

Plantations agro Industrielles de bananes destinées à l'export

**1.9. Pays dans lequel/lesquels les activités sont réalisées (si différent du point 1.7):**

## 2. Evaluation de la mise en œuvre des activités de l'Action

---

### 2.1. Rappel du contexte de l'étude

La maladie des raies noires (MRN) est la principale contrainte parasitaire des plantations agro-industrielles de bananes dessert. Cette maladie foliaire, présente dans la majeure partie des zones de production de bananes dans le monde, est provoquée par le champignon ascomycète et aérien *Mycosphaerella fijiensis*. Les attaques de ce champignon peuvent entraîner une réduction de l'activité photosynthétique et des pertes de rendement variant de 10 à 100%. Toutefois, l'effet le plus important de la maladie est indirect car les régimes

---

récoltés sur les plants fortement affectés ont une durée de conservation fortement réduite et ne peuvent donc pas être exportés. En l'absence de variétés résistantes (non disponibles à ce jour), la culture intensive de la banane dessert pour l'export n'est donc réalisable qu'au moyen d'un contrôle chimique rigoureux de cette maladie. Au Cameroun, *M. fijiensis* a été signalé pour la première fois en 1981. A la fin des années 80, une méthode d'avertissement utilisant des descripteurs biologiques a été mise au point et appliquée avec succès, limitant ainsi le nombre d'applications à 12-14 par an. Cette lutte raisonnée par avertissement reposait fortement sur l'emploi de fongicides systémiques ayant un fort effet curatif. Malheureusement, depuis 1996 l'apparition de souches résistantes aux fongicides systémiques a entraîné l'abandon de cette stratégie au détriment d'une méthode de lutte plus systématique reposant majoritairement sur l'emploi de fongicides de contact. Les fongicides de contact ne provoquent pas l'apparition de souches résistantes, mais ils n'ont pas d'effet curatif sur la maladie, et sont donc utilisés préventivement. Ainsi, en 2006, malgré un souci constant de continuer à piloter la lutte chimique par l'observation de descripteurs biologiques, environ 40 traitements ont été effectués sur la majorité des plantations. Cette augmentation du nombre de traitements a entraîné une augmentation du coût de la lutte, mais également des risques environnementaux. En effet, en plus de l'augmentation des quantités de matière active liées à l'accroissement du nombre de traitements, les fongicides de contact sont épandus à des doses plus importantes que les fongicides systémiques. De nouvelles stratégies de traitement doivent être aujourd'hui redéfinies pour retrouver une situation plus durable sur les plans économiques et environnementaux

## **2.2. Rappel des objectifs de l'étude et de la méthodologie**

### **2.2.1. Objectifs**

Les observations récentes des derniers monitoring montrent qu'il y a une baisse des niveaux de résistance dans certaines plantations commerciales du Cameroun, plus particulièrement depuis que les fongicides systémiques ne sont plus ou peu employés. Cette évolution permet de penser que les phénomènes de résistance aux fongicides sont peut être réversibles.

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de cette évolution récente des niveaux de résistance :

- des flux de gènes provenant des zones non traitées (effectifs élevés de populations sensibles aux fongicides), vers les plantations commerciales (effectifs faibles de populations résistantes) qui pourraient entraîner une « dilution » progressive du phénomène de résistance
- une perte de compétitivité des souches résistantes qui seraient alors progressivement éliminées lorsque la pression de sélection fongicide est arrêtée (plus de traitements avec des fongicides systémiques)

L'objectif de cette étude est ainsi de :

- Mesurer l'évolution dans le temps du niveau de résistance aux fongicides systémiques dans les populations pathogènes de *M. fijiensis* des plantations industrielles du Cameroun.
- Définir les conditions d'un réemploi éventuel des fongicides systémiques dans le cadre des différentes stratégies de traitement utilisées au Cameroun. Plus particulièrement est visée la possibilité de réutiliser des stratégies de traitement basées sur un système d'avertissement.

### **2.2.2. Méthodologie**

Le programme de travail de cette étude a été regroupé en 5 activités spécifiques qui permettront de répondre aux objectifs de l'étude :

**Activité spécifique 1.** Améliorer les méthodes d'évaluation de la résistance aux fongicides.

**Activité spécifique 2.** Evaluer les niveaux de résistance dans les différentes plantations commerciales du Cameroun.

**Activité spécifique 3.** Mesurer les flux de gènes entre les plantations non traitées et les plantations commerciales.

**Activité spécifique 4.** Mesurer l'impact de stratégies de traitement sur la résistance aux fongicides

**Activité spécifique 5.** Evaluer la compétitivité des souches résistantes par rapport aux souches sensibles

### **2.3. Résumé de l'Action**

**Activité spécifique 1.** Améliorer les méthodes d'évaluation de la résistance aux fongicides.

Nous avons cherché à développer une nouvelle technique qui permette de mesurer l'évolution des résistances dans les plantations avec une plus grande fiabilité, ce qui n'était pas le cas de la technique basée sur des tests de germination d'ascospores (problèmes de représentativité des populations analysées, risques de confusions lors des lectures et impossibilité de réaliser les tests à certaines périodes de l'année).

La technique que nous avons développée est basée sur des tests de germination de conidies. Après un certain nombre de mises au point techniques et de vérifications, on peut maintenant avancer que cette technique présente de nombreux avantages :

- elle donne des résultats plus fiables et plus répétables que la méthode ascospore pour tous les fongicides testés. Cette meilleure fiabilité résulte du fait qu'elle réduit les problèmes de représentativité des populations analysées et qu'il n'y a plus de confusion entre les différentes espèces fongiques présentes chez le bananier.
- cette méthode permet de respecter un plan d'échantillonnage préétabli et surtout de réaliser les tests à toutes les périodes de l'année (pas d'échecs)

**Cette technique, qui est plus fiable, doit être celle qui sera utilisée pour les futurs monitoring de résistance.**

**Activité spécifique 2.** Evaluer les niveaux de résistance dans les différentes plantations commerciales du Cameroun.

Le suivi des résistances dans les plantations du Cameroun s'est fait au cours de 3 campagnes sur deux années. En général les monitorings demandés par les différentes plantations ont

surtout concerné des fongicides appartenant à la famille des triazoles. Toutefois, une partie des analyses a été réalisée sur 8 secteurs répartis dans les 3 plantations (PHP, CDC et SPM) avec les trois familles de fongicides systémiques (triazoles, strobilurines, benzimidazoles). Ces analyses ont été réalisées avec les deux méthodes et avec trois répétitions au cours de deux campagnes, en 2009 et 2010, et constituent donc une source d'information très solide de l'évolution des résistances sur cette période.

#### Benzimidazoles :

Dans certains secteurs de la PHP et de la SPM on a pu observer une très nette diminution du taux de résistance à ces fongicides qui est souvent inférieur à 5 %. Cette diminution est très nette par rapport aux niveaux de résistance qui avaient été observés en 2004 (30 à 60% de souches résistantes) date depuis laquelle ces fongicides ne sont plus utilisés. La fréquence des souches résistantes reste toutefois élevée dans certains secteurs de plantation (Singa, Penja Est).

Dans les plantations de la CDC, le niveau de sensibilité vis-à-vis des benzimidazones reste généralement bon.

#### Strobilurines

Dans certains secteurs de la PHP et de la SPM on a pu observer une très nette diminution du taux de résistance à ces fongicides qui est souvent inférieur à 10 %. Cette diminution est très nette par rapport aux niveaux de résistance qui avaient été observés en 2004 (30 à 80% de souches résistantes) date depuis laquelle ces fongicides ne sont plus utilisés. La fréquence des souches résistantes reste toutefois élevée dans certains secteurs de plantation (Singa, Penja Est), et l'emploi récent dans certaines plantations de la PHP (Mantem) a entraîné une augmentation du taux de souches résistantes.

Dans les plantations de la CDC, cette étude a permis de mettre en évidence, pour la première fois, l'apparition de souches résistantes aux strobilurines. Cette évolution est liée au fait que ces fongicides étaient encore employés dans cette compagnie.

#### Triazoles

Même si la dégradation de la sensibilité aux triazoles n'est pas perceptible avec tous les produits appartenant à cette famille chimique, il faut remarquer que dans toutes les plantations analysées, le niveau de sensibilité au propiconazole est faible et a diminué entre les deux campagnes de 2009 et 2010. Cette dégradation montre qu'il y a une érosion constante et continue de la sensibilité vis-à-vis des triazoles qui est liée à l'emploi continu de ces fongicides à raison de 3 à 6 traitements par an. La dérive de sensibilité est également importante dans les plantations de la CDC, ce qui est un fait récent.

Cette étude a permis de confirmer que **la résistance aux benzimidazoles et aux strobilurines a effectivement baissé depuis qu'ils ne sont plus utilisés. Il reste toutefois encore un fond de résistance qui ne permet de conseiller encore leur utilisation.** Toutefois il y a toute raison d'être optimiste quant à la **possibilité de pouvoir les réemployer, à l'horizon de quelques années, dans certains secteurs de plantation et dans le cadre de stratégies raisonnées sur avertissement.**

**En ce qui concerne les triazoles, le niveau de sensibilité se dégrade régulièrement, et nous déconseillons fortement leur emploi au cours de la prochaine campagne afin de revenir à de meilleurs niveaux de sensibilité.**

**Ainsi, à l'horizon de 2 ou 3 ans, il paraît envisageable de récupérer un ou deux fongicides systémiques et de les réintégrer, avec une nouvelle famille chimique qui sera bientôt disponible (des inhibiteurs de la respiration de type SDH), dans le cadre d'une stratégie raisonnée qui permettrait de réduire le nombre de traitements et la quantité de matière active épandue.**

**Activité spécifique 3.** Mesurer les flux de gènes entre les plantations non traitées et les plantations commerciales.

Ce travail a été réalisé à partir de méthodes indirectes reposant sur des études de génétique des populations et sur des approches directes.

#### Structure génétique des populations

Au cours de cette étude, nous avons étudié la structure génétique des populations dans une zone large qui encadre toutes les plantations industrielles et qui est comprise dans un rectangle formé par Douala, Loum, Kumba et Buea. Il n'y a pas de structure génétique des populations dans cette zone à partir de marqueurs neutres.

Par ailleurs nous avons également montré que des populations échantillonnées à l'intérieur d'un grand ensemble de plantation et dans l'environnement immédiat sont génétiquement identiques, à partir de marqueurs neutres.

Cela montre que **les flux de gènes dans toute la zone étudiée sont importants** et que **ni les barrières naturelles** (forêts, montagne, fleuve), **ni des barrières liées à l'activité humaine** (grands ensembles de plantation d'hévéa, de palmier à huile) et **ni les traitements effectués sur les plantations commerciales n'influencent la structure génétique des populations.**

#### Dispersion des souches résistantes

A partir d'une plantation commerciale dans laquelle le niveau de résistance aux strobilurines était de l'ordre 20-25 %, nous avons montré que la dispersion de la résistance dans des bananiers plantains limitrophes était très faible. Par ailleurs entre l'échantillonnage réalisé en 2009 et celui réalisé en 2010 le niveau de résistance mesuré à l'intérieur de la parcelle commerciale a diminué entre les deux échantillonnages (18% en 2009 et 10 % en 2010).

Cela confirme bien que **les flux de gènes se font préférentiellement de la zone non traitée vers la zone traitée et que ces flux sont à même de contribuer à une dilution progressive de la résistance au cours du temps.**

#### Mesure de paramètres de dispersion par des approches indirectes

La présence d'un front de rencontre entre deux populations génétiquement différenciées nous a permis de mesurer un paramètre de dispersion à partir de l'évolution de la zone de contact entre ces deux populations au cours du temps. Cette méthode indirecte nous a permis de déduire que **la dispersion moyenne était d'environ 1500 mètres par génération.**

## Mesure de paramètres de dispersion par des approches directes

Au cours de cette étude nous avons mesuré la dispersion directe du champignon à partir d'un lâcher de spores résistantes aux strobilurines à partir d'une source placée au centre d'un dispositif de bananiers plantés à différentes distances de l'implantation de la source d'inoculum. Ce dispositif s'étendait sur 8 axes de 1 km et les bananiers étaient traités avec des strobilurines ce qui a permis de compter les lésions qui étaient seulement dues à la source. Cela nous a permis de mesurer la dispersion du champignon à différentes distances de la source et d'en déduire une fonction de dispersion de ce pathogène.

Ces observations montrent que **la très grande majorité des ascospores disperse sur une distance d'une quarantaine de mètres, mais que des événements de dispersion peuvent toujours se produire à des distances d'1 km.**

**Activité spécifique 4.** Mesurer l'impact de stratégies de traitement sur la résistance aux fongicides

Cette étude est menée avec deux types de fongicides : un triazole et une strobilurine. Pour cette étude **deux parcelles de bananier de 1 ha chacune ont été plantées dans des zones de palmeraie** (à l'abri des flux de gènes) sur les sites de Mbonjo et de Maleke. Deux épidémies ont alors été installées dans ces parcelles à partir de feuilles prélevées dans des parcelles dans lesquelles il y avait un fond de résistance aux strobilurines et aux triazoles.

Parallèlement, un travail a été mené afin de **déterminer de quelle façon sera mesurée l'évolution de la résistance** sur ce dispositif et surtout **de quelle façon seront évalués des paramètres de sélection**. Le coefficient de sélection correspond au différentiel d'accroissement entre des individus résistants et des individus sensibles et on peut le mesurer (i) à partir de l'évolution de la fréquence des souches résistantes dans le cas des strobilurines et (ii) à partir de l'évolution de la moyenne de la CI50 de la population et de sa variance dans le cas des triazoles.

Les traitements fongicides permettront alors de mesurer un coefficient de sélection pour ces deux fongicides. Lorsque les traitements seront arrêtés, si les niveaux de résistance diminuent on pourra alors mesurer une contre-sélection pour ces deux fongicides et ainsi en déduire qu'il y a un coût de la résistance qui se traduit par une moindre compétitivité des souches résistantes.

**Activité spécifique 5.** Evaluer la compétitivité des souches résistantes par rapport aux souches sensibles

Deux collections de souches ont été réalisées afin de mesurer l'agressivité de souches sensibles et résistantes aux triazoles et aux strobilurines. La deuxième étape a consisté à caractériser ces deux collections afin d'effectuer un choix pertinent pour les études en inoculations contrôlées.

### Strobilurines :

108 souches ont été collectées afin de vérifier la présence de la mutation conférant la résistance à ce fongicide par des analyses moléculaires. **34 souches présentaient bien cette mutation et pourront être choisies pour cette étude**

## Triazoles :

200 souches ont été collectées afin d'être caractérisées en fonction de leur facteur de résistance pour une gamme de 8 fongicides appartenant à la famille des triazoles (le facteur de résistance est le rapport de la CI50 d'une souche résistante sur la CI50 d'une souche sensible). Cette caractérisation ne peut pas se faire par des méthodes moléculaires et a été réalisée dans un premier temps par mesure de croissance mycélienne dans un automate de Bayer en Allemagne. Cependant cette technique n'était pas fiable et une nouvelle technique a été mise au point sur un panel des souches. Cette technique sera ensuite étendue au reste de la collection pour finaliser le choix des souches.

Une collection de souches sensibles a aussi été réalisée, et par la suite l'agressivité des souches sensibles et résistantes (aux strobilurines et aux triazoles) sera comparée au travers d'inoculations contrôlées.

## **2.4. Activités et résultats**

### ***2.4.1. Activité spécifique 1 : Améliorer les méthodes d'évaluation de la résistance aux fongicides.***

La méthode communément utilisée (et recommandée par le FRAC) pour évaluer les niveaux de résistance repose sur des tests de germination d'ascospores du champignon, ces ascospores étant obtenues par décharge de nécroses récoltées au champ. Cependant, cette méthode présente de nombreux inconvénients :

- la production d'ascospores par les nécroses foliaires est très hétérogène, ce qui affecte la représentativité de l'échantillon collecté au champ du fait de fortes distorsions entre les différents fragments collectés. Cette distorsion peut être aggravée par la façon d'échantillonner ensuite les ascospores pour lesquelles on effectuera une mesure au microscope (50 à 100 ascospores sont 'choisies' pour cette lecture). Il est fortement possible que cette hétérogénéité affecte la nature des résultats obtenus.
- dans certains cas il n'y a pas de sporulation et le test ne peut pas être réalisé, notamment en saison sèche. Cette méthode n'est donc pas adaptée à des suivis réguliers au cours du temps.
- cette méthode ne permet pas de respecter un plan d'échantillonnage préétabli
- pour chaque fongicide (y compris le témoin sans fongicide), les lectures sont faites sur des populations différentes
- enfin, d'autres ascospores appartenant à d'autres espèces du genre *Mycosphaerella* sont présentes en mélange avec *M. fijiensis*. Il est parfois difficile de discriminer les ascospores des différentes espèces et des confusions sont possibles lors des lectures au microscope, surtout sur des milieux amendés en fongicide.

Pour mener à bien l'ensemble de ce projet il était donc indispensable de développer une technique qui réponde à ces différents points.



#### 2.4.1.1. Développement d'une méthode basée sur la germination des conidies

Nous avons opté pour le développement d'une technique basée sur des tests de germination de conidies. En effet, en théorie cette technique pourrait résoudre une grande partie de ces différents inconvénients :

- les conidies sont produites sur de jeunes lésions (stades 2-3), ce qui permet de s'affranchir de la présence de stades nécrotiques. Les jeunes lésions peuvent être obtenues dans toutes les parcelles que l'on souhaite échantillonner. Dans ces conditions il est possible de respecter un plan d'échantillonnage préétabli et aussi de faire des mesures successives dans le temps sur ce plan d'échantillonnage.
- il semble que la sporulation conidienne soit plus régulière que la sporulation ascosporee, et qu'il n'y ait pas de distorsion dans les échantillonnages. Dans ce cas on peut raisonner un échantillonnage à partir de la répartition spatiale des bananiers sur lesquels on va prélever un fragment foliaire à partir duquel on sélectionnera un petit nombre de lésions.
- toutes les conidies d'une même lésion sont supposées appartenir à un même génotype et sont donc considérées comme identiques. Si l'on peut transférer les conidies d'une même lésion sur différents milieux, alors on peut réellement observer une même population échantillonnée sur les différents fongicides (au moins sur un fongicide et sur le témoin sans fongicide)
- il n'y a aucune distorsion d'échantillonnage au cours des lectures car une lésion = un même isolat et la population analysée = population de lésions échantillonnée.
- il n'y a plus aucun risque de confusion, car il n'y a pas d'autre espèce qui produise des conidies (que l'on peut aussi distinguer morphologiquement) dans les stades 2-3.

Afin de mettre au point cette technique, il a fallu cependant un certain nombre de mises au point techniques.

##### *a. La sporulation conidienne est-elle régulière et permet-elle de respecter un plan d'échantillonnage préétabli ?*

Lors des premiers tests effectués, des lésions de stades 3-4 avaient été sélectionnées au laboratoire et les conidies transférées à l'aveugle sur une boîte de Pétri en appliquant la lésion sur le milieu (Photo). Cette technique s'était soldée par de nombreux échecs car certaines lésions ne produisaient pas de conidies, ou parfois le nombre de conidie était faible et la croissance des tubes germinatifs sur le témoin sans fongicide était aussi parfois relativement faible ce qui affectait la fiabilité des mesures (Figure 1). Ainsi, pour que la lecture soit fiable, il est nécessaire qu'elle puisse se faire sur un nombre de conidies important, car si toutes les conidies ont un même génotype, leur état physiologique peut altérer la germination et la lecture devra se faire sur les conidies les plus développées.



Une amélioration notable a été apportée à la méthode en (i) sélectionnant au champ des feuilles portant de jeunes stades de la maladie (stades 2 et 3) (ii) effectuant une sélection de lésions fortement sporulantes à la loupe binoculaire avant leur utilisation pour le test.

Cette amélioration a considérablement diminué le nombre d'échecs et a également permis d'obtenir des observations cohérentes et fiables après lecture comme l'ont montré les lectures faites sur le témoin sans fongicide (Figure 1).

**Cette amélioration de la technique a permis d'obtenir une sporulation conidienne régulière qui permet de respecter un plan d'échantillonnage préétabli.**

**Figure 1. Exemple de lectures effectuées avec des lésions non sélectionnées ou des lésions sélectionnées à la loupe binoculaire (amélioration de la méthode). Dans cet exemple 30 isolats ont été déposés à la fois sur le milieu témoin sans fongicide (0 ppm) et sur le milieu avec fongicide à la dose de 0.1 ppm.**

***Application de lésions non sélectionnées***

	0 ppm	0,1 ppm
1	12	
2	7	2
3		
4	7	5
5	8	0
6	10	3
7	15	0
8	7	3
9		2
10	7	0
11	16	0
12		3
13		5
14	5	3
15		
16	7	3
17	7	0
18	7	0
19	12	4
20	12	3
21	13	3
22		3
23	8	5
24	5	
25	8	3
26	11	0
27	19	
28		0
29	7	2
30	8	4

***Application de lésions sélectionnées***

	0 ppm	0,1 ppm
1	26	13
2	30	11
3	22	21
4	20	5
5	29	14
6	22	16
7	25	15
8	23	14
9	23	20
10	27	16
11	25	18
12	19	10
13	27	14
14	27	11
15	29	10
16	24	20
17	27	5
18	32	9
19	25	13
20	21	4
21	24	15
22	26	12
23	25	10
24	34	3
25	28	11
26	24	8
27	22	10
28	31	9
29	23	13
30	25	21

***b. Est-il possible d'analyser une même lésion sur plusieurs milieux fongicides ?***

L'idée est de pouvoir utiliser une même lésion sur plusieurs milieux amendés à différents fongicides sans toutefois que la germination des conidies ne soit affectée par le transfert de lésion d'un milieu à un autre.

Cette possibilité a été évaluée de la façon suivante :

- 60 lésions fortement sporulantes ont été sélectionnées
- Chaque lésion a été appliquée successivement sur : (1) un milieu témoin sans fongicide ; (2) un milieu amendé en Tilt (0.1 ppm) ; (3) un milieu amendé en bankit (10 ppm) ; (4) un milieu amendé en Callis ; et (5) sur un nouveau milieu témoin non amendé en fongicide.
- On a alors comparé la longueur des tubes germinatifs sur le premier et le dernier témoin sans fongicide pour évaluer l'influence des différents fongicides sur la germination des spores.
- Cet essai a été répété trois fois

**Les résultats de cette étude montrent que la germination n'est pas significativement différente sur les deux témoins (tableau 1), ce qui permet d'envisager d'utiliser une même lésion sur une gamme de différents fongicides**

**Tableau 1. Croissance moyenne des tubes germinatifs des conidies sur le témoin initial et le témoin final après l'application d'une même lésion sur une gamme de trois fongicides différents**

Répétition	Témoin initial	Témoin final
1	18.9	18.0
2	20.5	19.3
3	20.5	19.6

*c. Les phénotypes de germination des conidies permettent ils de renseigner la présence de mutations conférant la résistance aux fongicides ?*

Pour deux classes de fongicides, les benzimidazoles et les strobilurines, la résistance est conférée par une simple mutation sur un gène. Il est attendu que la germination des spores en présence du fongicide renseigne sur la présence ou l'absence de cette mutation. Toutefois il y a un certain nombre de cas où il est difficile de déduire cette information du phénotype de germination :

- dans le cas des benzimidazoles, pour les individus sensibles les tubes germinatifs sont déformés ou bien il n'y a pas de germination. Pour les individus résistants, la germination est comparable à celle du témoin et parfois il peut ne pas y avoir de germination si les spores ne sont plus viables. Dans certains cas, les tubes germinatifs ne sont pas déformés, mais ils sont très inhibés et les tubes germinatifs inférieurs à 100  $\mu\text{m}$  sont classés dans une catégorie 'courts' que l'on ne sait pas bien interpréter : s'agit-il d'individus portant ou pas la mutation conférant la résistance ?

- dans le cas des strobilurines, les conidies portant la mutation peuvent germer mais ont une germination inhibée. Toutefois, il subsiste un flou sur la limite à utiliser pour qu'une souche soit considérée comme sensible ou résistante.

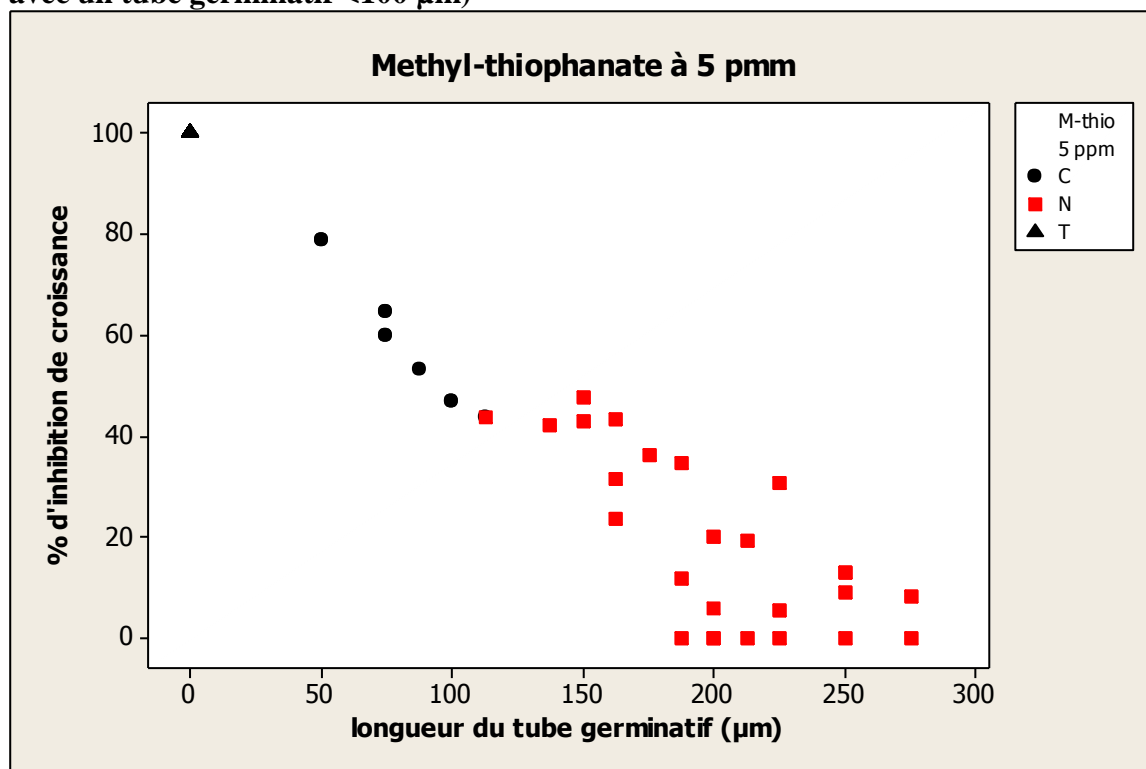
Pour évacuer ces doutes nous avons constitué deux collections d'isolats sensibles et résistants à ces deux groupes de fongicides afin de comparer leur phénotype de germination en présence du fongicide avec la présence ou l'absence de la mutation conférant la résistance à ces deux fongicides.

#### Cas des benzimidazoles

Pour les benzimidazoles, la collection d'isolats sensibles et résistants a été réalisée à partir de phénotypages effectués sur 82 lésions. A partir de ces 82 lésions 104 souches ont été isolées par clonage (il y a parfois plus d'une souche isolée par lésion) et 8 isolats non phénotypés ont été rajoutés à cette collection pour un total de 112 souches. Les ADN de ces 112 souches ont été extraits puis la recherche de la mutation conférant la résistance aux benzimidazoles a été faite par pyroséquençage (les analyses ont été partiellement réalisées chez Bayer). Pour chacune des 82 lésions collectées, le phénotype de germination a été évalué sur 6 différents milieux (témoin, thiophanate 5 ppm, méthyl thiophanate 10 ppm, thiabendazole 5 ppm, thiabendazole 10 ppm, et Callis 5 ppm). Cette observation des phénotypes (longueur des tubes germinatifs et % d'inhibition de croissance) sur lésions ne montre pas de fort regroupement entre les souches pour lesquelles on a considéré que le phénotype était 'court' et celle pour lesquelles on a considéré le phénotype comme 'résistant' (figure 2), et la limite

de 100  $\mu\text{m}$  apparaît comme étant arbitraire. La comparaison des phénotypes sur lésions et des génotypes des souches isolées semble montrer que les souches pour lesquelles on observe des tubes germinatifs courts et résistants portent bien la mutation qui confère la résistance aux benzimidazoles alors que celles pour lesquelles le phénotype de germination est tordu ou non germé (sensibles) ne la portent pas (Tableau 2). Il y a quelques exceptions qui sont signalées en gris dans ce tableau, notamment lorsque le phénotype est différent pour les différents milieux avec un fongicide de la même famille. Ces anomalies peuvent être imputées à des mélanges de plusieurs souches dans les lésions et l'ensemble des souches clonées ont donc été phénotypées à partir des conidies produites par en culture artificielle (plus de mélange possible).

**Figure 2. Caractérisation des phénotypes à partir des lésions pour la collection de souches résistantes et sensibles aux benzimidazoles. Les symboles correspondent aux différentes souches ayant un phénotype Sensible (Tordus ou germés) ; Résistants (germination normale avec un tube germinatif  $> 100 \mu\text{m}$ ) ; Courts (germination normale avec un tube germinatif  $< 100 \mu\text{m}$ )**



**Tableau 2. Comparaison des phénotypes sur lésion et des génotypes pour la collection de souches résistantes et sensibles aux benzimidazoles**

Phénotype sur lésion Génotype	Non déterminé	Résistants et courts	Résistants	Courts	Sensibles (tordus ou non germés)	Courts et sensibles	Total
R	6	41	10	1	2	4	64
S	2	-	-	2	43	1	48

Les résultats obtenus confirment bien que les souches considérées comme ayant un phénotype ‘court’ possèdent dans tous les cas la mutation qui confère la résistance aux benzimidazoles, tout comme les souches ayant un phénotype ‘résistant’.

En conclusion, le phénotype de germination sur un milieu amendé avec un benzimidazole permet de discriminer les souches résistantes des sensibles :

- on doit considérer que les souches qui ont une germination non déformée sur un milieu enrichi en benzimidazole possèdent bien la mutation sur le codon 198 qui confère la résistance à ce fongicide.
- les souches sensibles ne germent pas ou elles ont un tube germinatif déformé

### Cas des strobilurines

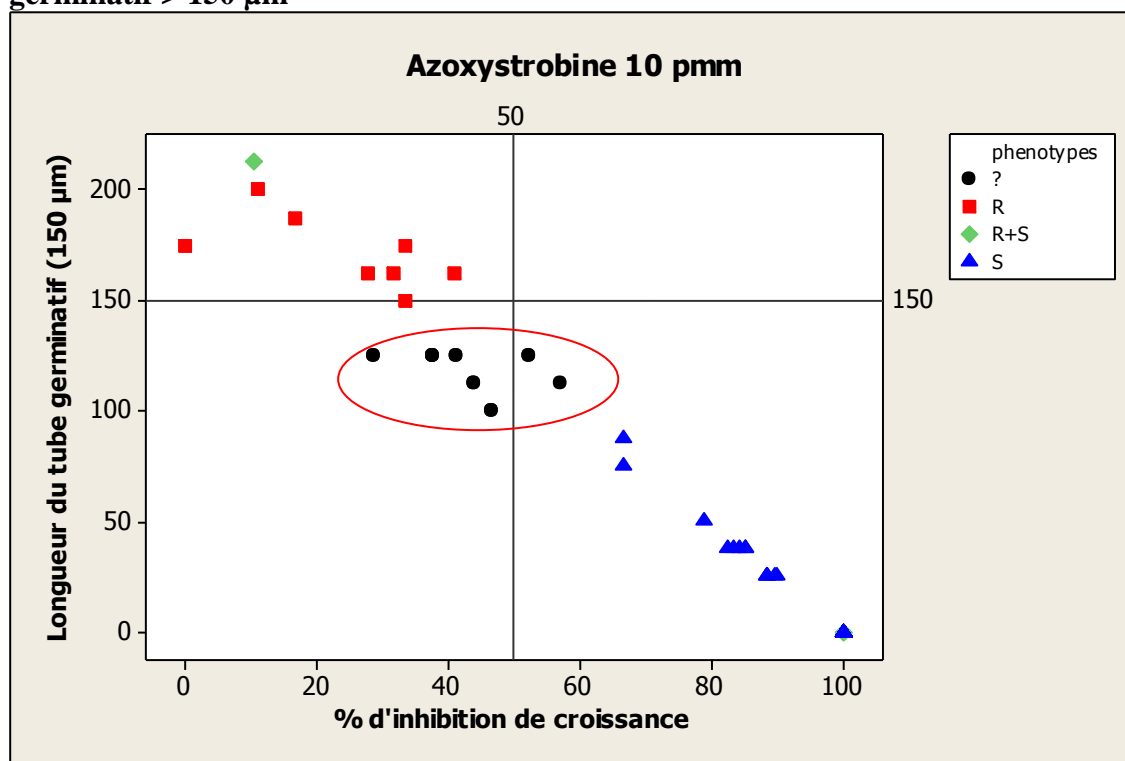
Pour les strobilurines, la collection d’isolats sensibles et résistants a été réalisée à partir de phénotypages réalisés sur 91 lésions et 8 isolats non phénotypés ont été rajoutés à cette collection. A partir de chaque lésion une souche a été isolée par clonage pour un total de 99 souches. Les ADN de ces 99 souches ont été extraits puis la recherche de la mutation conférant la résistance aux strobilurines a été réalisée par pyroséquençage (les analyses ont été réalisées en partie chez Bayer). Pour chacune des 91 lésions le phénotypage a été réalisé sur 7 milieux avec différentes strobilurines (témoin, azoxystrobine 10 ppm, azoxystrobine 30 ppm, trifloxystrobine 10 ppm, trifloxystrobine 30 ppm, Bankit 10 ppm et tega 10 ppm). Dans quelques cas le phénotype de germination (longueur du tube germinatif et % d’inhibition de croissance n’a pas permis de définir à priori si la souche était sensible ou résistante et ces cas ont été considérés comme litigieux (figure 3). La comparaison des phénotypes sur lésions et des génotypes des souches isolées est en général conforme aux attentes (Tableau 3) à quelques exceptions près qui sont signalées en gris dans ce tableau. Ces quelques anomalies, notamment lorsque la réponse est différente pour les différents milieux avec un fongicide de la même famille, peuvent être imputées à des mélanges de souches dans les lésions et l’ensemble de ces souches ont aussi été phénotypées à partir des conidies produites par les souches clonées (plus de mélange possible).

Les résultats obtenus montrent que la limite de 150 µm ne permet pas de discriminer les souches résistantes des souches sensibles (cette limite serait plutôt de l’ordre de 80µm). Il semble surtout que le % d’inhibition de croissance permette mieux de séparer les souches sensibles des résistantes la limite se situant entre 50 et 60% d’inhibition de croissance (figure 4).

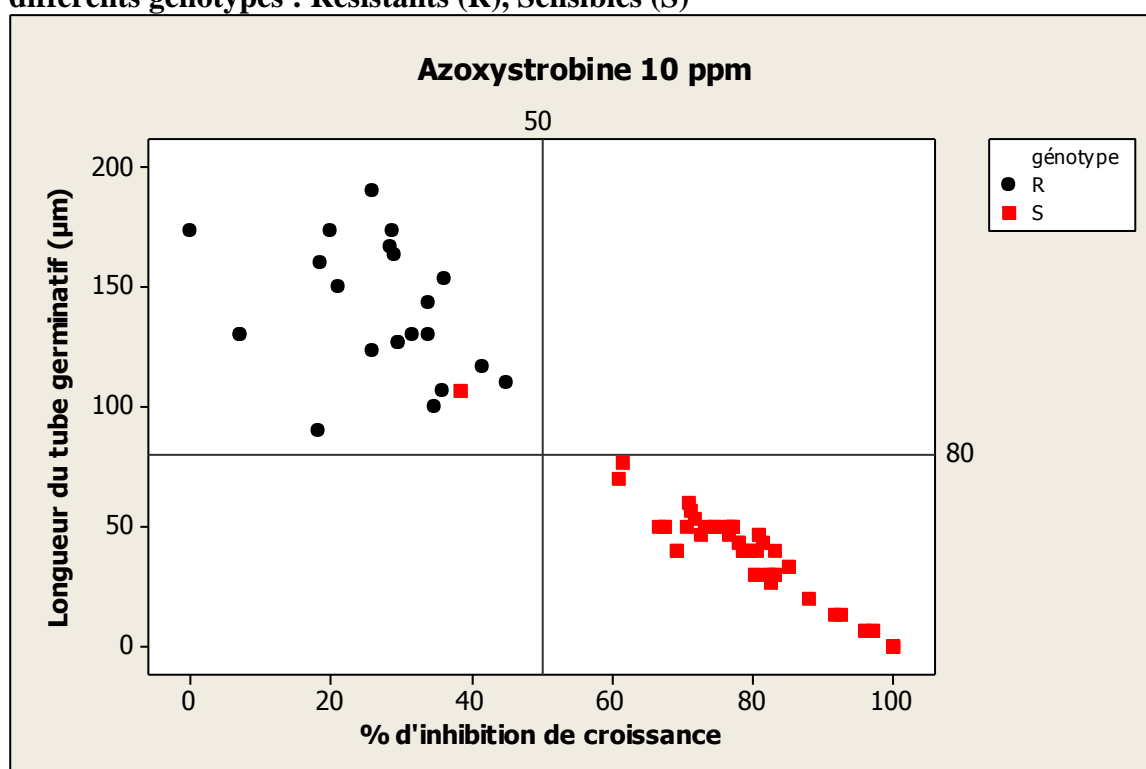
**Tableau 3. Comparaison des phénotypes sur lésion et des génotypes pour la collection de souches résistantes et sensibles aux strobilurines**

Génotypes/ phénotypes sur lésions	Non déterminé	Résistants	Sensibles	Litigieux	Résistants plus sensibles	Total
R	7	14	1	7	-	29
S	-	1	66	2	1	70

**Figure 3. Caractérisation des phénotypes à partir des lésions pour la collection de souches résistantes et sensibles aux strobilurines. Les symboles correspondent aux différents phénotypes : Litigieux (?); Résistants (R), Sensibles (S) et Résistants + sensibles (R+S). Selon les normes du FRAC les souches résistantes ont un tube germinatif > 150  $\mu$ m**



**Figure 4. Caractérisation des phénotypes à partir des conidies produites par des cultures de souches résistantes et sensibles aux strobilurines. Les symboles correspondent aux différents génotypes : Résistants (R), Sensibles (S)**



En conclusion, il semble que le phénotype de germination sur un milieu enrichi de 10 ppm d'azoxystrobine puisse permettre de discriminer les souches portant la mutation G143A conférant la résistance à ce fongicide à condition de fixer rationnellement des limites, notamment en % d'inhibition de croissance

*d. Existe-il de la diversité génétique au sein d'une population de conidies produites par une même lésion ?*

La technique faisant appel aux conidies repose sur le postulat que toutes les conidies d'une même lésion sont génétiquement identiques car elles sont issues de la reproduction asexuée. Toutefois, il est possible que des lésions soient si proches qu'elles ne puissent pas être différenciées à l'œil nu et des mélanges d'individus ont déjà été observés lors de génotypages réalisés à partir d'ADN extraits de lésions. Il était donc nécessaire d'évaluer le risque que plusieurs individus soient en mélange dans une même lésion de façon à déterminer s'il représente un obstacle à la mise en œuvre de la méthode conidienne. Cela s'est fait par deux approches complémentaires :

Utilisation de phénotypes de germination

Pour cette étude nous avons prélevé une centaine de lésions dans un site dans lequel il y a environ 50% de souches résistantes aux benzimidazoles. Pour chacune de ces lésions, toutes les conidies ont été déposées, par applications successives de la lésion, sur un milieu contenant du méthyl-thiophanate à la concentration de 5 ppm. La germination de toutes les conidies a été observée 48 h après afin de déterminer si elles étaient de type sensible (tubes germinatifs tordus ou pas de germination) ou résistant (tubes germinatifs normaux ou courts). Sachant qu'il y a environ 50% de souches résistantes dans la population, il y a ainsi pour chaque conidie observée 50% de chances de ne pas détecter un mélange alors qu'il y a réellement un mélange.

Sur 102 lésions analysées seulement 7 lésions contenaient un mélange de souches sensibles et résistantes. Dans les lésions en mélange, les mélanges ont été souvent très disproportionnés et un des deux phénotypes était souvent très minoritaire (< 10 % voire moins) et ces conidies étaient souvent très localisées sur un côté de la lésion. Cette observation permet de penser que les mélanges restent peu fréquents et souvent localisés sur la bordure d'une lésion. La concentration des lectures sur le centre des lésions devrait permettre de s'affranchir d'éventuels mélanges qui sont de toute façon relativement rares.

Génotypage d'individus avec des marqueurs microsatellites

Pour cette étude, nous avons cloné une dizaine de souches pour chacune des lésions caractérisées par phénotypage. La comparaison des profils obtenus avec 9 marqueurs microsatellites a permis de caractériser chaque individu et de définir avec une très forte probabilité l'identité génétique de tous les individus isolés sur une même lésion (il est très improbable que deux souches différentes aient le même profil avec ces 9 marqueurs).



Ce travail a pu être réalisé sur 32 lésions et a permis de repérer 4 nouveaux cas de mélanges qui n'avaient pas été détectés par phénotypage. Inversement, dans 2 cas le génotypage n'a pas permis de repérer les mélanges observés par phénotypage mais cela correspond à des lésions pour lesquelles le génotype en mélange était à un taux inférieur à 1%. Comme seulement une dizaine de conidies ont été génotypées pour ces 2 lésions, la probabilité de mettre ces mélanges en évidence était faible.

**A la lumière des premiers résultats obtenus, il semble que les mélanges de génotypes soient peu fréquents au sein d'une même lésion (environ 15% des cas). Par ailleurs, dans la majorité des cas, le génotype en mélange est très minoritaire et il apparaît donc, qu'avec un certain nombre de précautions, ces mélanges ne soient pas à même de compromettre la technique conidienne.**

*e. Conclusion générale sur la méthode de monitoring*

Au cours de cette étude nous avons mis au point une nouvelle méthode qui permet d'améliorer sensiblement la fiabilité des tests de monitoring de résistance. Cette méthode présente un certain nombre d'avantages que n'avait pas la méthode ascospore:

- elle permet de respecter un plan d'échantillonnage préétabli et aussi de faire des mesures successives dans le temps sur ce plan d'échantillonnage. Il n'y a ainsi plus de distorsion d'échantillonnage et le test peut être mené à n'importe quelle période et site sans risque d'échec de la sporulation.
- on peut analyser la même population de souches sur différents milieux fongicides et un témoin sans fongicide
- il n'y a plus aucun risque de confusion avec d'autres espèces.

**Cette nouvelle technique représente une avancée majeure.** Elle sera ultérieurement publiée dans une revue scientifique puis proposée au FRAC afin qu'elle soit reconnue par l'ensemble de la communauté scientifique travaillant sur cette thématique.

#### ***2.4.2. Activité spécifique 2. Evaluer les niveaux de résistance dans les différentes plantations commerciales du Cameroun.***

Les contacts avec les plantations ont été pris et un programme d'analyse a été établi avec les responsables techniques des différentes plantations. Le principe de réserver un certain nombre d'analyses par plantation pour comparer les méthodes conidies et ascospores a été accepté par tous les partenaires du projet. Pour étoffer un peu plus cette comparaison, nous avons décidé de réaliser 3 répétitions avec chaque méthode, ce qui permet en outre d'avoir une meilleure idée de la fiabilité des mesures avec chaque méthode.

D'une façon générale, les analyses se sont faites en deux temps pour certaines plantations, de manière à réaliser une campagne en début de saison des pluies (avril à juin) et une autre en fin de saison des pluies (octobre à décembre). Le tableau suivant permet de resituer les demandes des différentes plantations pour les campagnes des années 2009 et 2010 :

##### 2.4.2.1. Comparaison des monitorings avec les deux méthodes ascospore et conidies

L'objectif de cette comparaison était multiple :

- Pour les plantations de la PHP et de la SPM : confirmer la baisse de la résistance aux fongicides pour les trois grands groupes de fongicides systémiques que sont les Triazoles (Tilt), les Strobilurines (Bankit) et les benzimidazoles (Callis). Pour ce faire 4 secteurs ont été choisis à la PHP (Tiko, Mantem, Penja Est et Mpoula 2) et à un à la SPM (Singa).
- Pour les plantations de la CDC/Del Monte : détecter l'apparition de souches résistantes qui n'avait jusque là pas été mise en évidence. Pour ce faire trois secteurs ont été choisis à Tiko, Ekona et Mussaka.
- Pour l'ensemble des plantations : confirmer ces évolutions avec fiabilité. Pour cela, nous avons utilisé les deux méthodes de monitoring ; celle utilisant les ascospores et celle utilisant les conidies ; et nous avons fait trois répétitions sur le même échantillon prélevé au champ. Cela nous a permis en outre de mettre à l'épreuve les deux méthodes d'évaluation.

Deux campagnes de prélèvement ont été réalisées en 2009 et en 2010 (tableau 4). En 2010 nous avons également décidé de rajouter à cette étude deux zones non traitées qui serviront de référence.

##### Résultats pour les triazoles :

Pour les triazoles (Tilt à 0,1 ppm) nous avons analysé les résultats à partir des deux descripteurs suivants (Figure 5):

- le % moyen d'inhibition de croissance de la population analysée (50 ascospores ou 50 conidies). Dans les zones non traitées, cette valeur oscille entre 85 et 88 % avec la méthode ascospore et 80 et 88 % avec la méthode conidie.
- la proportion des souches de la population analysée qui a un % d'inhibition de croissance < 50 %, cette valeur étant nulle dans les zones non traitées.

**Tableau 4. Détail des échantillonnages pour les deux campagnes de comparaison des méthodes ascospores et conidies**

Secteurs retenus	Fongicides analysés	Méthodes	Répétitions	Nb analyses campagne1 /2009	Nb analyses campagne 2 /2010
<b>Tiko/PHP</b>	Ti, Bk, Ca	As + Co	3	18	18
<b>Mantem/PHP</b>	Ti, Bk, Ca	As + Co	3	18	18
<b>Penja Est/PHP</b>	Ti, Bk, Ca	As + Co	3	18	18
<b>Mpoula 2/PHP</b>	Ti, Bk, Ca	As + Co	3	18	18
<b>Tiko/CDC</b>	Ti, Bk, Ca	As + Co	3	18	18
<b>Ekona/CDC</b>	Ti, Bk, Ca	As + Co	3	18	18
<b>Mussaka/CDC</b>	Ti, Bk, Ca	As + Co	3	18	18
<b>Singa/SPM</b>	Ti, Bk, Ca	As + Co	3	18	18
<b>Lala/SPM</b>	Ti, Bk, Ca	As + Co	3	18	
<b>Non traité 1</b>		As + Co	3		18
<b>Non traité 2</b>		As + Co	3		18
<b>Total</b>				162	180

Ti = Tilt ; Bk = Bankit ; Ca = Callis

**Figure 5. Résultats des deux campagnes de comparaison pour le Tilt à 0,1 ppm. (le tableau du bas montre le détail des 3 répétitions par mesure)**

	% inhibition moyen propiconazole 0,1 ppm			
Secteurs	Conidies 2009	Conidies 2010	Ascospores 2009	Ascospores 2010
<b>Lala</b>	<b>32</b>	<b>-</b>	<b>31</b>	
<b>Singa</b>	<b>31</b>	<b>83</b>	<b>-</b>	<b>50</b>
<b>Tiko CDC</b>	<b>44</b>	<b>31</b>	<b>39</b>	<b>36</b>
<b>Ekona</b>	<b>24</b>	<b>42</b>	<b>44</b>	<b>45</b>
<b>Mussaka</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>55</b>	<b>43</b>
<b>Tiko PHP</b>	<b>39</b>	<b>37</b>	<b>-</b>	<b>43</b>
<b>Penja Est</b>	<b>44</b>	<b>40</b>	<b>-</b>	<b>42</b>
<b>Mpoula 2</b>	<b>40</b>	<b>-</b>	<b>35</b>	<b>-</b>
<b>Mantem</b>	<b>50</b>	<b>31</b>	<b>-</b>	<b>43</b>
<b>Non traité 1</b>	<b>-</b>	<b>81</b>	<b>-</b>	<b>86</b>
<b>Non traité 2</b>	<b>-</b>	<b>88</b>	<b>-</b>	<b>87</b>

	% inhibition croissance <50 %			
Secteurs	Conidies 2009	Conidies 2010	Ascospores 2009	Ascospores 2010
<b>Lala</b>	<b>74</b>	<b>-</b>	<b>89</b>	<b>-</b>
<b>Singa</b>	<b>77</b>	<b>5</b>	<b>34</b>	
<b>Tiko CDC</b>	<b>54</b>	<b>75</b>	<b>49</b>	<b>73</b>
<b>Ekona</b>	<b>85</b>	<b>71</b>	<b>61</b>	<b>51</b>
<b>Mussaka</b>	<b>56</b>	<b>55</b>	<b>40</b>	<b>65</b>
<b>Tiko PHP</b>	<b>74</b>	<b>71</b>	<b>-</b>	<b>56</b>
<b>Penja Est</b>	<b>65</b>	<b>83</b>	<b>-</b>	<b>67</b>
<b>Mpoula 2</b>	<b>71</b>	<b>-</b>	<b>79</b>	<b>-</b>
<b>Mantem</b>	<b>54</b>	<b>86</b>	<b>-</b>	<b>65</b>
<b>Non traité 1</b>	<b>-</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>0</b>
<b>Non traité 2</b>	<b>-</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>0</b>

Secteur	répétition	2009 asco	2009 coni	2010 asco	2010 coni	2009 asco	2009 coni	2010 asco	2010 coni
		% moyen d'inhibition de croissance				% avec inhibition < 50%			
Lala/SPM	1	30	36			88	71		
Lala/SPM	2	30	25			94	86		
Lala/SPM	3	32	34			86	64		
Singa/SPM	1	61	33	51	83	34	68	48	9
Singa/SPM	2	-	26	52	84	-	88	50	2
Singa/SPM	3	-	34	47	81	-	75	50	4
Tiko/PHP	1	-	35	44	39	-	84	62	80
Tiko/PHP	2	-	41	44	38	-	66	44	62
Tiko/PHP	3	-	41	40	33	-	72	62	70
Penja Est/PHP	1	-	45	37	39	-	58	74	87
Penja Est/PHP	2	-	46	44	38	-	58	60	87
Penja Est/PHP	3	-	40	45	43	-	80	68	76
Mpoula 2/PHP	1	31	34			90	81		
Mpoula 2/PHP	2	37	43			80	63		
Mpoula 2/PHP	3	36	42			66	70		
Mantem/PHP	1	38	51	46	29	76	50	58	82
Mantem/PHP	2	-	50	38	30	-	60	78	90
Mantem/PHP	3	-	50	44	34	-	52	58	86
Tiko/CDC	1	53	48	31	30	34	41	72	78
Tiko/CDC	2	21	45	33	29	74	60	80	75
Tiko/CDC	3	42	39	44	34	58	62	68	72
Ekona/CDC	1	40	25	42	43	68	88	50	66
Ekona/CDC	2	47	14	46	41	46	94	54	78
Ekona/CDC	3	44	33	47	43	70	74	50	70
Mussaka/CDC	1	53	53	50	47	42	46	54	60
Mussaka/CDC	2	52	48	42	51	60	52	66	47
Mussaka/CDC	3	61	38	36	49	18	69	74	57
Non traité 1	1			87	80			0	0
Non traité 1	2			86	81			0	0
Non traité 1	3			85	81			0	0
Non traité 2	1			88	87			0	0
Non traité 2	2			87	88			0	0
Non traité 2	3			85	88			0	0

Toutes les analyses effectuées dans les secteurs des plantations industrielles montrent **qu'il y a une nette perte de sensibilité à ce fongicide en comparaison avec les zones non traitées (figure 5)**. A une exception près, les deux méthodes ne donnent pas de résultats divergents et il y a en général peu de variations pour le % moyen d'inhibition de croissance entre les trois répétitions d'un même échantillon. Toutefois, il y a eu des cas où le test n'a pas pu être fait avec les ascospores par manque de sporulation.

Sur les secteurs de la PHP entre les deux campagnes on observe plutôt une érosion continue de la sensibilité à ce fongicide. Cette dégradation doit être rapprochée d'un usage toujours en cours des triazoles dans ces plantations. **Cet usage doit être proscrit.**

Sur les secteurs de la CDC la situation s'est dégradée à Tiko mais est relativement stationnaire sur Ekona et Mussaka. Toutefois, pour les trois secteurs de plantation les faibles % moyen d'inhibition et la forte proportion de souches dans les classes de faible inhibition (<50%) témoignent d'une importante utilisation des triazoles dans ces plantations et d'une dérive prononcée de la sensibilité aux triazoles dans les plantations de la CDC. **Cette importante dérive de sensibilité est un phénomène récent à la CDC et cette étude a permis de montrer qu'il est maintenant bien établi.**

Pour la SPM, les résultats de 2010 sont très surprenants car les deux méthodes donnent des résultats radicalement différents : forte dérive de sensibilité avec les ascospores et situation proche de la zone non traitée avec la méthode conidie. Ce résultat s'explique probablement par le fait que les populations analysées avec les deux méthodes n'ont pas infecté les bananiers aux mêmes périodes (les populations de conidies sont plus récentes) et pourrait traduire une importante inflexion de la population dans ce secteur. Cette inflexion pourrait traduire une moindre utilisation des triazoles en fin d'année ainsi que des flux de gènes en provenance de zones non traitées.

#### Résultats pour les strobilurines :

En fonction des résultats obtenus au cours de l'AS1 nous avons considéré comme résistantes les souches qui avaient un % d'inhibition de croissance avec ce fongicide inférieur à 50%.

Tout d'abord on note qu'en tendance générale les valeurs de % de résistance mesurées avec la méthode ascospore sont souvent supérieures à celles qui ont été mesurées avec la méthode conidie (figure 6). De fortes variations sont souvent observées entre les répétitions avec la méthode ascospore, ce qui n'est pas le cas de la méthode conidie. Ces différences entre les deux méthodes peuvent être liées au fait que lors de la lecture on va plus facilement repérer des ascospores qui germent et donc probablement artificiellement déformer la population choisie lors de la lecture, d'autant plus que les ascospores non germées sont alors plus difficiles à repérer. Cela ne se produit pas avec la méthode conidie car la population est fixée à l'avance et cette méthode semble donner des résultats plus répétables pour ce fongicide et ce sont ces résultats que nous discuterons pour chaque plantation. Par ailleurs dans certains cas le test n'a pas pu être fait avec les ascospores par manque de sporulation.

Pour la SPM, ce fongicide n'est plus utilisé depuis 2005. Sur Singa on note une diminution du taux de souches résistantes entre les deux campagnes (35% en 2009 contre 19 % en 2010). Par ailleurs, il faut rapprocher ces valeurs des valeurs élevées observées fin 2004 (plus de 80 %). Ainsi, depuis l'arrêt de l'emploi de ce fongicide, on assiste bien à une diminution du % de souches résistantes.

**Figure 6. Evolution des taux de résistance aux strobilurines au cours des deux campagnes de comparaison pour le Bankit à 10 ppm. (le tableau du bas montre le détail des 3 répétitions par mesure)**

Secteurs	Conidies 2009	Conidies 2010	Ascospores 2009	Ascospores 2010
Lala	7	-	29	-
Singa	35	19	37	28
Tiko CDC	0	5	3	19
Ekona	0	0	0	3
Mussaka	3	9	27	21
Tiko PHP	2	2	-	29
Penja Est	11	5	-	20
Mpoula 2	6	-	1	-
Mantem	5	10	-	20
Non traité 1	-	2	-	0
Non traité 2	-	0	-	0

Secteur	répétition	2009 asco	2009 coni	2010 asco	2010 coni
Lala/SPM	1	28	6		
Lala/SPM	2	24	8		
Lala/SPM	3	36	8		
Singa/SPM	1	38	32	24	20
Singa/SPM	2	40	40	22	18
Singa/SPM	3	32	32	38	18
Tiko/PHP	1	-	3	32	2
Tiko/PHP	2	-	3	24	4
Tiko/PHP	3	-	0	30	0
Penja Est/PHP	1	-	14	38	8
Penja Est/PHP	2	-	12	4	4
Penja Est/PHP	3	-	8	18	2
Mpoula 2/PHP	1	4	2		
Mpoula 2/PHP	2	0	10		
Mpoula 2/PHP	3	0	6		
Mantem/PHP	1	-	6	50	10
Mantem/PHP	2	-	8	10	12
Mantem/PHP	3	-	2	0	8
Tiko/CDC	1	8	0	6	4
Tiko/CDC	2	2	0	42	2
Tiko/CDC	3	0	0	10	8
Ekona/CDC	1	0	0	0	0
Ekona/CDC	2	0	0	10	0
Ekona/CDC	3	0	0	0	0
Mussaka/CDC	1	18	0	46	8
Mussaka/CDC	2	38	7	10	10
Mussaka/CDC	3	24	3	6	10
Non traité 1	1			0	4
Non traité 1	2			0	0
Non traité 1	3			0	2
Non traité 2	1			0	0
Non traité 2	2			0	0
Non traité 2	3			0	0

Pour la PHP il y a une diminution des taux de résistance entre les deux campagnes sur PHP Est (11 à 5 %) tandis que ce % reste stable à un faible niveau à Tiko (2%). Ces valeurs sont là aussi bien inférieures à celles de début 2005 date à partir de laquelle les strobilurines n'ont plus été employées à la PHP et les données observées semblent bien confirmer une diminution de la résistance à ce fongicide sur les plantations de la PHP depuis que les strobilurines ne

sont plus employées. Toutefois, sur le secteur de Mantem on observe une légère augmentation entre les deux campagnes qui doit être rapprochée du fait qu'un traitement avec une strobilurine a été réalisé entre ces deux campagnes sur ce secteur.

Pour la CDC on a vu apparaître en 2009 les premiers cas de résistance aux strobilurines et cela a été confirmé par la seconde campagne de 2010. Il s'agit d'un fait nouveau sur cette plantation dans laquelle ces fongicides étaient encore employés.

#### Résultats pour les benzimidazoles :

Pour ce fongicide, là encore nous avons pris en compte les résultats de l'AS1 et considéré que:

- les souches sensibles ont un tube germinatif déformé ou bien ne germent pas en présence du fongicide
- les souches résistantes ont un tube germinatif normal ou court en présence du fongicide

On observe en général peu de différences entre les deux méthodes même si la technique conidienne semble donner des valeurs plus stables entre les 3 répétitions. Par ailleurs dans certains cas le test n'a pas pu être fait avec les ascospores par manque de sporulation. C'est donc sur les valeurs de la méthode conidie que se font les commentaires suivants.

Pour la SPM entre 2005 et 2009 on a assisté à une nette diminution du % de résistance aux benzimidazoles : respectivement 27 et 41 % de souches résistantes à Lala et Singa en 2005 contre 4 et 27% en 2009. En revanche entre les deux campagnes le % de souches résistantes n'a pas diminué à Singa.

Pour la PHP entre 2005 et 2009 on a assisté à une nette diminution du % de résistance aux benzimidazoles : respectivement 28, 49, 38 et 35 % de souches résistantes à Tiko, Penja Est, Mpoula et Mantem en 2005 contre 0, 22, 4 et 5% en 2009. En revanche entre les deux campagnes le % de souches résistantes n'a pas trop diminué sur les différents secteurs analysés.

Pour la CDC, les souches résistantes n'avaient jamais été détectées durablement dans cette plantation. Il n'y a pas de souches résistantes aux benzimidazoles sur les secteurs d'Ekona et de Mussaka. En revanche, sur le secteur de Tiko il semble que des souches résistantes commencent à être observées notamment avec les ascospores, même si le taux reste faible avec les conidies.

Figure 7. Evolution des taux de résistance aux benzimidazoles au cours des deux campagnes de comparaison pour le Callis à 5 ppm (le tableau du bas montre le détail des 3 répétitions par mesure)

Secteurs	Conidies 2009	Conidies 2010	Ascospores 2009	Ascospores 2010
Lala	4	-	10	-
Singa	27	30	37	37
Tiko CDC	1	2	0	18
Ekona	1	0	0	0
Mussaka	0	0	0	0
Tiko PHP	0	1	0	0
Penja Est	22	18	22	10
Mpoula 2	4	-	3	-
Mantem	5	5	0	0
Non traité 1	-	0	-	0
Non traité 2	-	0	-	0

Secteur	répétition	2009 asco	2009 coni	2010 asco	2010 coni
Lala/SPM	1	17	4		
Lala/SPM	2	13	5		
Lala/SPM	3	0	2		
Singa/SPM	1	56	29	37	26
Singa/SPM	2	22	24	40	32
Singa/SPM	3	34	27	33	32
Tiko/PHP	1	-	0	0	4
Tiko/PHP	2	0	0	0	0
Tiko/PHP	3	-	0	0	0
Penja Est/PHP	1	6	38	0	18
Penja Est/PHP	2	17	22	20	16
Penja Est/PHP	3	43	6	10	20
Mpoula 2/PHP	1	3	2		
Mpoula 2/PHP	2	2	6		
Mpoula 2/PHP	3	3	4		
Mantem/PHP	1	0	6	0	2
Mantem/PHP	2	0	4	0	8
Mantem/PHP	3	0	6	0	4
Tiko/CDC	1	0	0	17	2
Tiko/CDC	2	0	2	17	4
Tiko/CDC	3	-	0	21	0
Ekona/CDC	1	0	2	0	0
Ekona/CDC	2	0	0	0	0
Ekona/CDC	3	0	0	0	0
Mussaka/CDC	1	0	0	0	0
Mussaka/CDC	2	0	0	0	0
Mussaka/CDC	3	0	0	0	0
Non traité 1	1			0	0
Non traité 1	2			0	0
Non traité 1	3			0	0
Non traité 2	1			0	0
Non traité 2	2			0	0
Non traité 2	3			0	0



#### 2.4.2.2. Monitoring 2009 et 2010 pour la PHP

Pour la PHP, il était prévu de réaliser 120 analyses/an dont une partie correspondait à la comparaison des deux méthodes sur les 4 secteurs choisis. Le reste des analyses ont été décidées par le responsable technique de la plantation et a surtout concerné des triazoles (Sico, Opal, Tilt) et des morpholines (Volley, Calixine, Impulse) et le Siganex (tableau 5).

**Tableau 5. Différents fongicides analysés au cours des trois campagnes à la PHP**

<b>Secteurs retenus</b>	<b>Analyses campagne 1/mai 09</b>	<b>Analyses campagne 2/nov 09</b>	<b>Analyses campagne 3/juillet 10</b>
<b>Bouba</b>	Si, Op, Sg	Si, Op, Vo	Op, Cx, Vo
<b>Boubou</b>	Si, Op, Sg	Si, Op, Vo	Op, Cx, Vo
<b>Diadia</b>	Si, Op, Sg	Si, Op, Vo	Op, Cx, Vo
<b>Sir</b>	Si, Op, Sg	Si, Op, Vo	Op, Cx, Vo
<b>Penja-est</b>	Si, Op, Sg	Si, Op, Vo	Si, Ti, Cx, Vo
<b>Sclm</b>	Si, Op	Si, Op, Vo	Si, Cx, Vo
<b>Mbomé</b>	Si, Op	Si, Op, Vo	Si, Ti, Cx, Vo
<b>Bonandam</b>	Si, Op, Sg	Si, Op, Vo	Si, Ti, Cx, Vo
<b>Php Bas</b>	Si, Op, Sg	Si, Op, Vo	Si, Op
<b>Php Haut</b>	Si, Op, Sg	Si, Op, Vo	Si, Ti, Cx, Vo
<b>Mpoula</b>	Si, Op, Sg	Si, Op, Vo	Si, Ti, Cx, Vo
<b>Nassif bas</b>	Si, Op, Sg	Si, Op	Si, Op
<b>Nassif Haut</b>	Si, Op, Sg	Si, Op	Si, Ti, Cx, Vo
<b>Loum</b>	Si, Op, Sg	Si, Op, Vo	Si, Op, Cx, Vo, Im
<b>Mantem</b>	Si, Op, Sg	Si, Op, Vo	Si, Op, Cx, Vo, Im
<b>Tiko</b>	Si, Op, Sg	Si, Op, Vo	Si, Op, Cx, Vo, Im
<b>Nyombé</b>	Si, Op, Sg	Si, Op, Vo	Si, Op, Cx, Vo, Im
<b>Total</b>	49	49	63

Si = Sico ; Op = Opal ; Ti = Tilt ; Sg = Siganex; Vo = Volley; Cx = Calixine; Im = Impulse

Comme nous l'avons vu plus haut, la sensibilité avec le Tilt qui est un triazole a diminué au cours de la période de l'étude. La situation est un peu différente avec d'autres triazoles comme le Sico pour lequel l'érosion de sensibilité est moins perceptible et fluctuante en fonction des campagnes et des secteurs (tableau 6). La campagne n° 2 réalisée en fin de saison des pluies semble montrer une plus forte dérive de sensibilité.

La sensibilité aux autres fongicides (morpholines et Siganex) est bonne et reste proche de celle des plantations non traitées.

**Tableau 6. Evolution du % moyen d'inhibition avec le Sico à 0,1 ppm sur les différents secteurs de la PHP au cours des trois campagnes**

Secteurs retenus	Analyses campagne 1/mai 09	Analyses campagne 2/nov 09	Analyses campagne 3/juillet 10
Bouba	87	63	-
Boubou	76	61	-
Diadia	77	59	-
Sir	77	62	-
Penja-est	86	73	80
Sclm	71	59	62
Mbomé	58	77	73
Bonandam	64	60	76
Php Bas	71	70	61
Php Haut	58	66	53
Mpoula	69	73	78
Nassif bas	75	-	65
Nassif Haut	70	83	78
Loum	75	54	84
Mantem	60	74	67
Tiko	67	70	87
Nyombé	65	75	68
Moyenne	71	67	72

#### 2.4.2.3. Monitoring 2009 et 2010 pour la SPM

Pour la SPM, il était prévu de réaliser 32 analyses/an dont une partie correspondait à la comparaison des deux méthodes sur le secteur de Singa. Le reste des analyses ont été décidées par le responsable technique de la plantation (tableau 7).

**Tableau 7. Différents fongicides analysés au cours des trois campagnes à la SPM**

Secteurs retenus	Analyses campagne 1/avril 09	Analyses campagne 2/janv 10	Analyses campagne 3/dec 10
Ndom	Si, Ti, Bk, Ca	Si, Ti, Bk, Ca	Si, Ti, Bk, Ca
Manengoteng	Si, Ti, Bk, Ca	Si, Ti, Bk, Ca	Si, Ti, Bk, Ca
Siège	Si, Ti, Bk, Ca	Si, Ti, Bk, Ca	Si, Ti, Ca
Singa	Bk, Tg	-	Ti, Bk, Ca

Si = Sico ; Ti = Tilt ; Bk = Bankit ; Ca = Callis

**Tableau 8. Evolution du % moyen d'inhibition avec le Sico à 0,1 ppm sur les différents secteurs de la SPM au cours des trois campagnes**

Secteurs retenus	Analyses campagne 1/avril 09	Analyses campagne 2/janv 10	Analyses campagne 3/dec 10
Ndom	85	75	83
Manengoteng	72	85	75
Siège	93	73	79

Comme nous l'avons vu plus haut, la sensibilité avec le Tilt qui est un triazole a diminué au cours de la période de l'étude. La situation est un peu différente avec d'autres triazoles comme le Sico pour lequel l'érosion de sensibilité est moins perceptible et fluctuante en fonction des campagnes et des secteurs (tableau 8).

La sensibilité aux autres fongicides (strobilurines et benzimidazoles) a connu des évolutions similaires à celles décrites dans le paragraphe précédent. Toutefois dans la zone de Ndom qui est une nouvelle plantation, la sensibilité à l'ensemble des fongicides reste bonne.

#### 2.4.2.4. Monitoring 2009 et 2010 pour la CDC/Del Monte

Pour la CDC, il était prévu de réaliser 78 analyses/an dont une partie correspondait à la comparaison des deux méthodes sur les 4 secteurs choisis. Le reste des analyses ont été décidées par le responsable technique de la plantation et a surtout concerné des triazoles (Sico, Opal, Baycor, tableau 5).

**Tableau 9. Différents fongicides analysés au cours des trois campagnes à la CDC**

<b>Secteurs retenus</b>	<b>Analyses campagne 1/juin 09</b>	<b>Analyses campagne 2/nov 09</b>	<b>Analyses campagne 3/oct 10</b>
<b>Mondoni 1</b>	Si, Op, By	-	-
<b>Mondoni 2</b>	Si, Op, By	Si, Op, By	Si, Op, By
<b>Moquo</b>	Si, Op, By	Si, Op, By	Si, Op, By
<b>Mafanja 1</b>	Si, Op, By	Si, Op, By	Si, Op, By
<b>Mafanja 2</b>	Si, Op, By	-	Si, Op, By
<b>Pungo</b>	Si, Op, By	-	Si, Op, By
<b>Benoe</b>	Si, Op, By	-	Si, Op, By
<b>Bwinga</b>	Si, Op, By	-	Si, Op, By
<b>Esuke</b>	Si, Op, By	-	Si, Op, By
<b>Ekona G8</b>	Si, Op, By	Si, Op, By,	Si, Op, By
<b>Ekona J6</b>	Si, Op, By	Si, Op, By	Si, Op, By
<b>Mussaka F1</b>	Si, Op, By	Si, Op, By	Si, Op, By
<b>Mussaka F5</b>	Si, Op, By	Si, Op, By,	Si, Op, By
<b>Total</b>	39	21	36

Si = Sico ; Op = Opal ; Ti = Tilt ; By = Baycor; Bk = Bankit ; Ca = Callis

Comme nous l'avons vu plus haut, la sensibilité avec le Tilt qui est un triazole a diminué au cours de la période de l'étude dans cette plantation, ce qui était un fait nouveau. La situation est un peu différente avec d'autres triazoles comme le Sico pour lequel l'érosion de sensibilité est moins perceptible et fluctuante en fonction des campagnes et des secteurs (tableau 10).

La sensibilité aux autres fongicides (strobilurines et benzimidazoles) a connu des évolutions similaires qui sont décrites dans le paragraphe précédent car ces fongicides n'ont pas fait de demande de la part du responsable de la plantation.

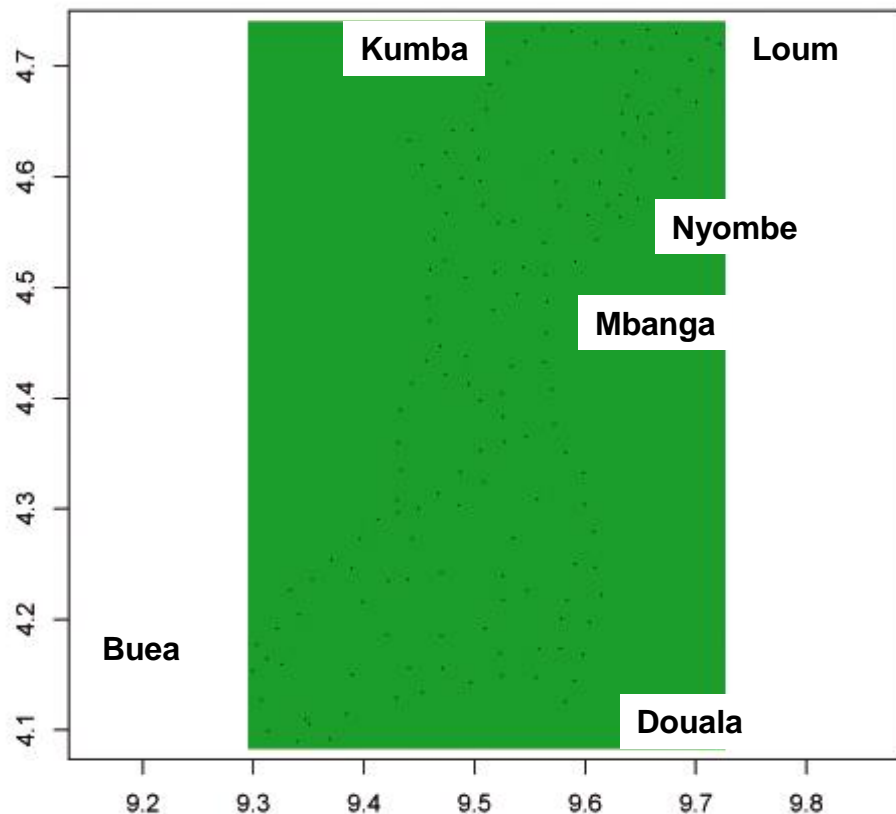
**Tableau 10. Evolution du % moyen d'inhibition avec le Sico à 0,1 ppm sur les différents secteurs de la CDC au cours des trois campagnes**

<b>Secteurs retenus</b>	<b>Analyses campagne 1/juin 09</b>	<b>Analyses campagne 2/nov 09</b>	<b>Analyses campagne 3/oct 10</b>
<b>Mondoni 1</b>	<b>43</b>		<b>-</b>
<b>Mondoni 2</b>	<b>45</b>	<b>69</b>	<b>75</b>
<b>Moquo</b>	<b>41</b>	<b>71</b>	<b>79</b>
<b>Mafanja 1</b>	<b>62</b>	<b>67</b>	<b>72</b>
<b>Mafanja 2</b>	<b>78</b>	<b>-</b>	<b>72</b>
<b>Pungo</b>	<b>81</b>	<b>-</b>	<b>76</b>
<b>Benoe</b>	<b>69</b>	<b>-</b>	<b>77</b>
<b>Bwinga</b>	<b>45</b>	<b>-</b>	<b>85</b>
<b>Esuke</b>	<b>77</b>	<b>-</b>	<b>85</b>
<b>Ekona G8</b>	<b>78</b>	<b>81</b>	<b>84</b>
<b>Ekona J6</b>	<b>79</b>	<b>73</b>	<b>77</b>
<b>Mussaka F1</b>	<b>68</b>	<b>80</b>	<b>80</b>
<b>Mussaka F5</b>	<b>69</b>	<b>79</b>	<b>79</b>

### **2.4.3. Activité spécifique 3. Mesurer les flux de gènes entre les plantations non traitées et les plantations commerciales.**

#### **2.4.3.1. Influence d'éléments paysagers sur la structure génétique des populations**

L'analyse de ces données a révélé une totale homogénéité génétique entre les souches échantillonnée au sein de cette zone (cf figure ci-dessous). Aucune structuration génétique n'a été détectée par les analyses moléculaires et statistiques. Ainsi, aucun effet de barrières aux flux de gènes des différents éléments considérés au sein de cette zone (bananeraies industrielles, forêt, plantations d'hévéa, fleuve Mungo) n'a été mis en évidence. Cette information, combinée avec le résultat précédemment obtenu (discontinuité génétique détectée au niveau kombone) confirme l'hypothèse historique d'une colonisation unique de *M.fijiensis* par le sud du pays (en provenance du Gabon) lors de l'arrivée de la maladie au Cameroun.



**Figure n° 8 : Répartition des individus en fonction de leurs coordonnées géographiques**

#### 2.4.3.2. Structure génétique des populations dans les plantations industrielles

Les analyses moléculaires, génétiques et statistiques des échantillons prélevés sur bananiers traités au sein de la plantation de la PHP ainsi que sur plantains non traités à l'extérieur de cette même plantation nous ont permis de montrer que :

- Les 6 populations échantillonnées au sein de la plantation de la PHP (populations traitées) sont génétiquement identiques (pas de différence de diversité génétique ou de structuration génétique)
- Les 6 populations échantillonnées à l'extérieur de la plantation de la PHP (populations non traitées) sont également génétiquement identiques (pas de différence de diversité génétique ou de structuration génétique)
- Les populations échantillonnées en zone industrielle et les populations échantillonnées en zone paysanne sont identiques entre elles (pas de différence de diversité génétique ou de structuration génétique)

Ce résultat semble confirmer la présence d'importants flux de gènes entre le compartiment paysan et le compartiment industriel ce qui a pour conséquence une homogénéisation des fréquences génétiques (et donc l'absence de différences entre toutes ces populations).

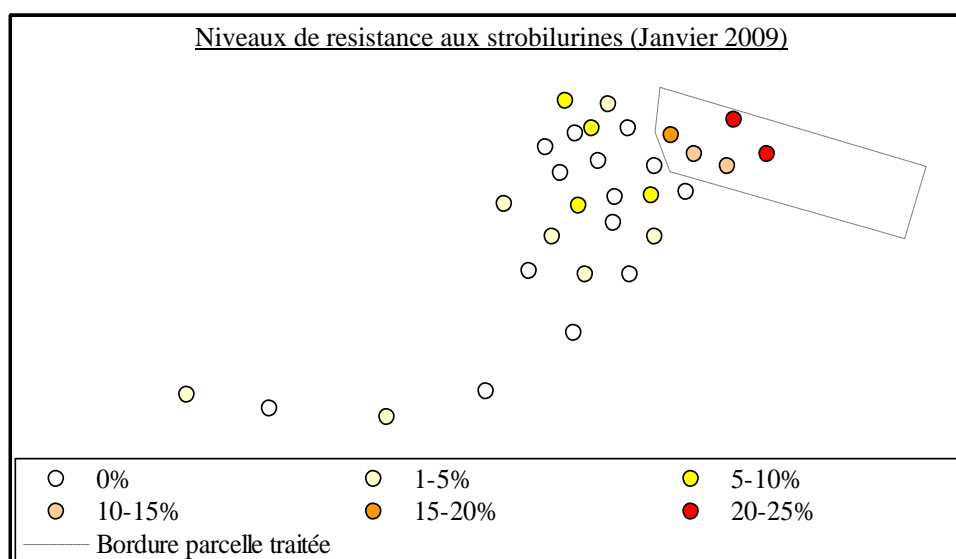
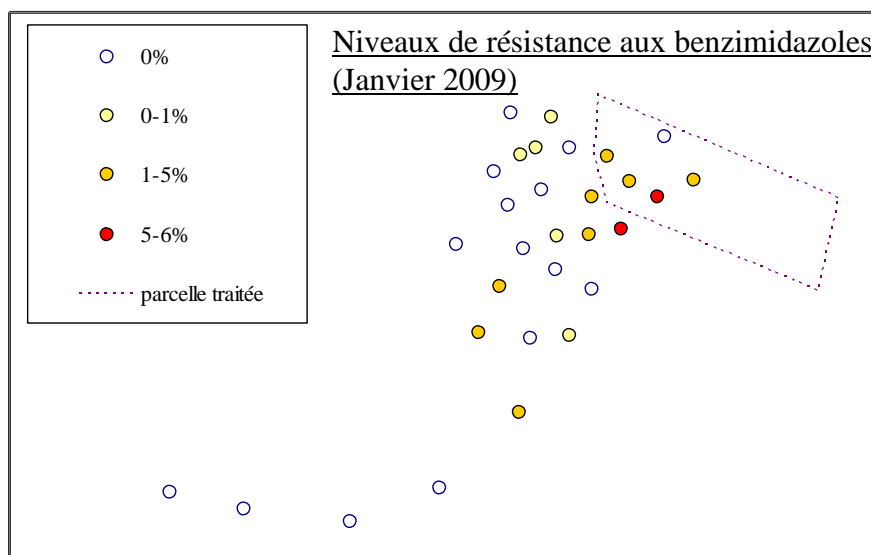
Populations	Diversité génétique moyenne	Nombre d'allèles moyen
Industrielle 1	0.387	2.300
Industrielle 2	0.335	2.250
Industrielle 3	0.322	2.050
Industrielle 4	0.331	2.000
Industrielle 5	0.336	2.000
Industrielle 6	0.345	2.150
<b>Moyenne idustrielles</b>	<b>0.343</b>	<b>2.125</b>
paysanne 1	0.361	2.100
paysanne 2	0.376	2.700
paysanne 3	0.329	2.300
paysanne 4	0.342	2.100
paysanne 5	0.348	2.200
paysanne 6	0.343	2.300
<b>Moyenne paysannes</b>	<b>0.350</b>	<b>2.283</b>

*\* Aucune différence significative n'a été détectée entre toutes les populations analysées*

**Tableau n°11 : Récapitulatif des valeurs de diversité génétique et de nombre d'allèles moyen au sein des populations échantillonnées**

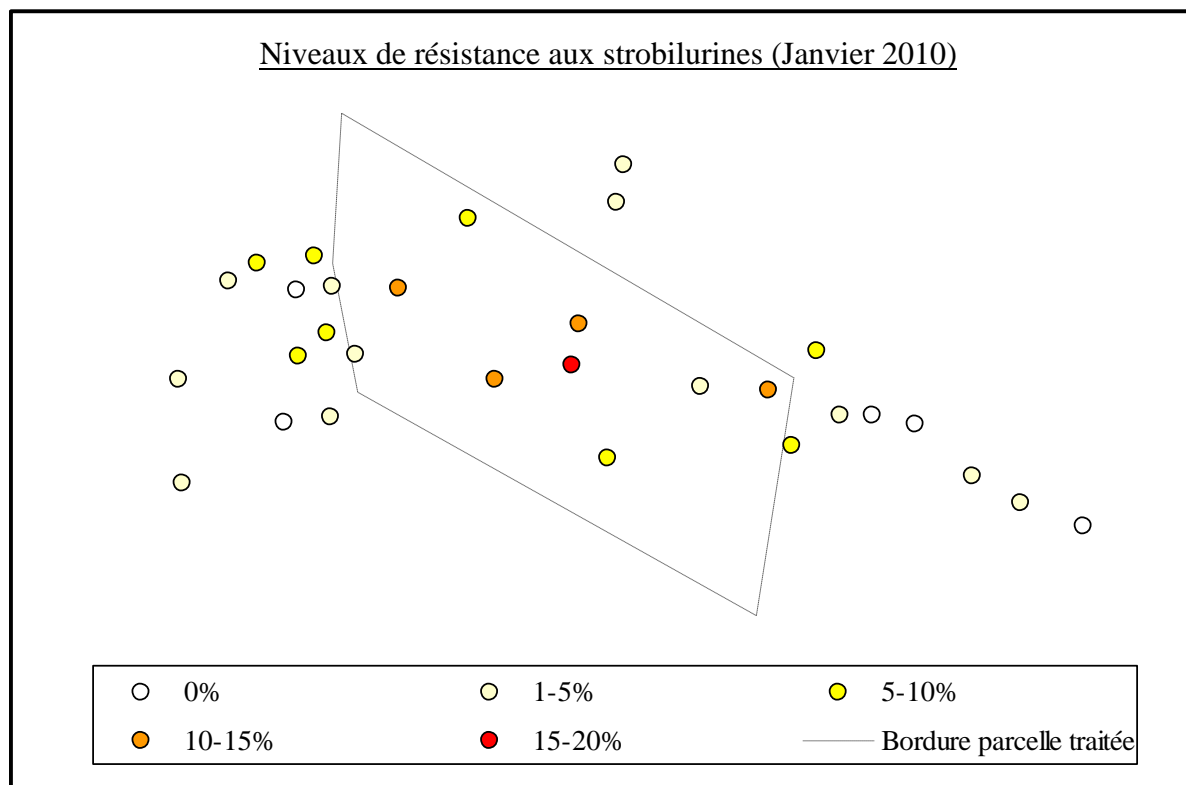
#### 2.4.3.3. Flux de gènes entre zones traitées et zones non traitées

Pour rappel, l'objectif de cette étude était de mettre en évidence un gradient de répartition (cline) des souches résistantes (pour deux fongicides, strobilurines et benzimidazoles) au sein d'une zone de contact entre une plantation traitée et une plantation non traitée afin d'estimer conjointement un paramètre de migration et de sélection. Un premier échantillonnage a été réalisé sur le site de la plantation de Lala en janvier 2009. Les résultats obtenus sont schématisés dans les deux figures ci-dessous :



- Ces premiers résultats ont permis de montrer que les niveaux de résistance aux benzimidazoles sont plutôt faibles au sein de cette zone. Cependant, nous ne disposons pas d'informations antérieures concernant les niveaux de résistance à ces fongicides. Concernant les niveaux de résistance aux strobilurines, cette analyse a permis de détecter des valeurs plus élevées que celles mesurées pour les benzimidazoles. En effet, les fréquences oscillent entre 10 et 25% au sein de la plantation industrielle et diminuent fortement et brutalement dans la zone paysanne. De plus, il est intéressant de noter que les niveaux de résistance aux strobilurines ont nettement diminué depuis quelques années au sein de cette parcelle. En effet, les derniers monitorings qui avaient été réalisés en 2005 au sein de cette zone montrent une fréquence moyenne de résistance aux strobilurines d'environ 80% au sein de la plantation industrielle.

- Suite a ces premiers résultats, un second échantillonnage (comprenant des nouveaux sites) a été réalisé en janvier 2010. Seule la résistance aux strobilurines a été mesurée (car les niveaux de résistance aux benzimidazoles se sont montrés très faibles suite à l'analyse précédente). Les résultats obtenus (présentés ci-dessous) montrent des niveaux de résistance aux strobilurines oscillant entre 5 et 20% en zone industrielle et entre 0 et 10% en zone paysanne. Les niveaux de résistances ont donc l'air d'avoir légèrement diminué depuis la précédente mesure. Des analyses statistiques plus fines visant à tester si cette baisse dans les niveaux de résistances aux strobilurine est significative sont actuellement en cours. Si cela s'avère le cas, il sera possible d'utiliser cette information pour inférer conjointement un paramètre de migration et de sélection.



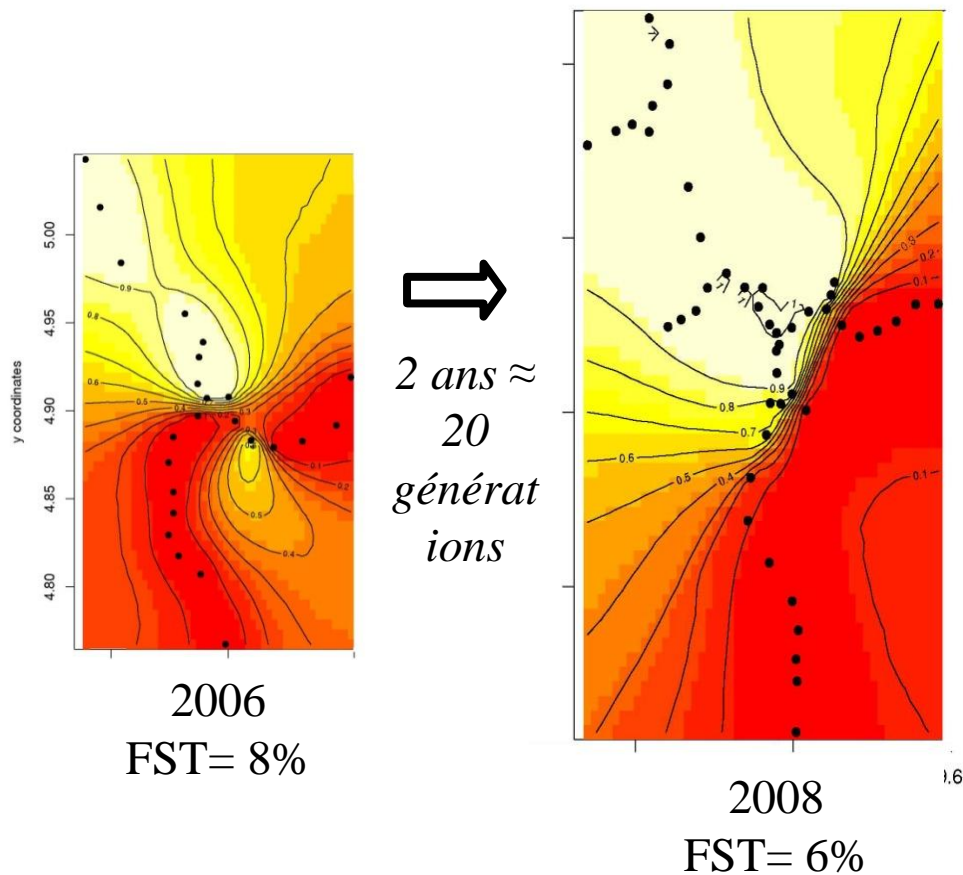
#### 2.4.3.4. Mesure indirecte d'un paramètre de dispersion

Les approches de génétique des populations peuvent permettre de mesurer des paramètres de migration qui permettent d'expliquer au mieux l'évolution des populations. C'est cette approche qui a été développée au cours de notre étude.

Si l'échantillonnage précédent (cf 2.4.3.1) n'a pas permis de détecter de structure génétique, une première étude réalisée en 2006 avait montré l'existence d'une zone de discontinuité génétique (mise en évidence de deux populations distinctes) au nord de la zone comprenant les plantations industrielles, au niveau de kombone. Cette zone a fait également l'objet d'un second échantillonnage en 2008. L'analyse de cet échantillon dans le cadre de notre étude a montré que la discontinuité génétique était toujours existante au même endroit (cf figure ci-dessous). Cependant, nous avons mis en évidence une baisse significative dans les niveaux de différenciation génétiques entre les deux populations (8% lors du premier échantillonnage et 6% lors de la seconde analyse). Cette baisse dans les niveaux de différenciation est prévisible et s'explique par l'effet homogénéisateur de la migration du champignon pathogène. En effet,



les individus des deux entités génétiques dispersent et se mélangent ce qui résulte en une baisse du niveau de différenciation par homogénéisation des fréquences génétiques. Une analyse statistique plus précise de ces modèles nous a permis d'estimer une dispersion moyenne des individus au sein de cette zone de 1500 mètres/génération.



**Figure n° 9. Répartition des différentes populations d'individus en fonction de leurs coordonnées géographiques pour les deux échantillonnages successifs.**

#### 2.4.3.5. Mesure directe de la dispersion du pathogène

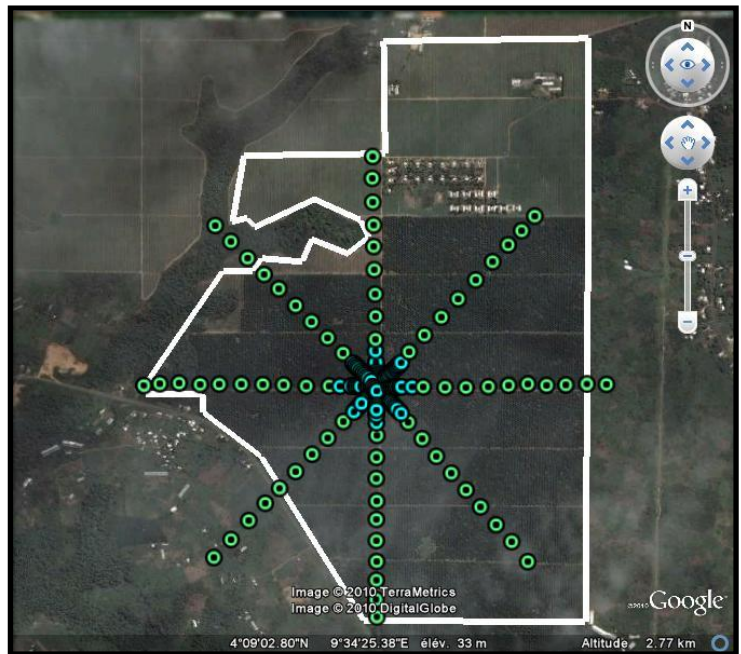
L'objectif de cette étude est de faire une mesure directe de la dispersion du pathogène sur une génération de spores. Le principe consiste à apporter une source d'inoculum avec un fort niveau de résistance aux strobilurines dans une parcelle de bananiers, localisée en dehors des zones traitées, où les souches résistantes ne sont pas présentes. La détection et la quantification des souches résistantes à différentes distances de la source a permis de mesurer le gradient de dispersion du champignon et d'obtenir une fonction de dispersion complète (y compris à grande distance). Cette expérimentation a été réalisée sur le site de la Socapalm. Cette zone est très favorable car elle renferme une grande surface homogène et dégagée sans bananiers (et donc sans maladie présente avant le début de l'expérimentation). Le système expérimental a été planté en juin 2010. Deux dispositifs ont été installés sur le même site de la Socapalm. Le premier dispositif a été utilisé pour la mesure de la dispersion des ascospores (spores sexuées) et le second dispositif pour la mesure de la dispersion des conidies (spores asexuées).

## Dispositif ascospores

Ce dispositif est schématisé sur la figure n° et consiste en la plantation de bananiers selon deux classes de distance et 8 directions afin de détecter l'influence de vents dominants sur la dispersion des spores. Les 2 classes de distances sont les suivantes :

→ La première concerne la dispersion entre 0 et 100m de la source, en faisant l'hypothèse que la majeure partie des ascospores disperseront sur cette distance. Dans cette zone, le maillage doit être assez fin et 1 bananier a été planté à chaque inter-rang d'hévéa soit tous les 8m (8 – 16 – 24 – 32 – 40 – 48 – 56 – 64 – 72 – 80 – 88 – 96 – 104 m. Soit 13 bananiers sur chacun des 8 axes = 104 bananiers en tout.

→ La seconde concerne la dispersion entre 100 et 1000m, sur laquelle on va tenter de mettre en évidence des événements plus rare de dispersion. Pour cela le maillage sera plus relâché. Par contre, afin d'augmenter la probabilité de détecter de faibles effectifs de spores à de plus grandes distances, le nombre de bananiers a été augmenté avec la distance. Ainsi sur cette gamme de distance le dispositif sera le suivant : 150 (1) – 200 (2)– 300 (3) – 400 (4)– 500 (5)– 600 (6)– 700 (7)– 800 (8)– 900 (9)– 1000m (10) (entre parenthèse le nombre de bananiers installés pour chaque classe de distance. Soit 55 bananiers sur chacun des 8 axes = 440 bananiers en tout.



## Dispositif conidies

Ce dispositif peut être considéré comme une miniature du dispositif ascospores. En effet, des bananiers ont également été plantés dans les 8 directions mais selon une seule classe de distance (0-25m) avec un plant tous les 2,5m soit 10 plants/axes.

## Etapes de la réalisation de l'expérimentation :

- 1- Entre juin et octobre, tous les bananiers des deux dispositifs ont été fertilisés afin de leur assurer une bonne croissance.
- 2- En octobre, tous les bananiers ont été traités au strobilurines. Le jour suivant (le 5/10/2010), la source de dispersion résistante aux strobilurines (ascospores ou conidies) a été installée au centre des deux dispositifs.
- 3- Les jours suivants, des observations ont été réalisées sur les bananiers pièges.
- 4- Le 17/10/2010, les premiers symptômes ont été observés sur les plants proches de la source de dispersion (centre de la parcelle)
- 5- Durant les jours qui ont suivi, un comptage des lésions sur tous les bananiers des deux dispositifs a été réalisé.

6- Ces lésions ont été découpées et ramenées en afin de vérifier que les symptômes observés présentent bien la résistance aux strobilurines (dans le but de confirmer qu'ils proviennent du centre de la parcelle). Ainsi, des analyses statistiques plus fines seront prochainement réalisées dans le but de mesurer la précieuse fonction de dispersion. Cette mesure se fera de façon indépendante pour les ascospores et pour les conidies.



*Photos représentant l'installation de la source de dispersion résistante au strobilurines (installée sur des bananiers artificiels) au centre de la parcelle ascospores*



*Photos représentant l'installation de la source de dispersion (résistante au strobilurines) au centre de la parcelle conidies*

#### 2.4.4. Activité spécifique 4 : Mesurer l'impact de stratégies de traitement sur la résistance aux fongicides

L'objectif de cette étude est de quantifier l'effet de la sélection exercée par deux fongicides systémiques sur l'évolution de la résistance.

##### Choix de fongicides

Ce travail est réalisé pour deux groupes de fongicides à mode d'action différents, choisis en fonction de leur originalité et de leur complémentarité en terme de modèle d'étude (tableau 1).

Tableau 1 : critères de choix des fongicides

	Triazoles	Strobilurine
Mode d'action	Inhibiteur de la biosynthèse des stérols du groupe 1 (IBS1)	Inhibiteur quinone de la respiration mitochondriale (QoI)
Représentant de la famille fongicide	propiconazole	trifloxystrobine
utilisation actuelle	En cours d'utilisation	En cours d'utilisation
Historique de développement de résistance	Lente (10 ans)	Rapide (3 ans)
Variation phénotypique de la résistance	Quantitative	Qualitative
cout de la résistance	Répertorié chez d'autres couples plante-pathogène	Non répertorié

(i) les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols du groupe 1 (IBS1), qui inhibent la déméthylation de l'éburicol. Ils appartiennent généralement à la famille des triazoles, dont le représentant est le propiconazole (Tilt) qui a été le produit de cette famille le plus utilisé au Cameroun. Pour cette famille de fongicide, la résistance est conférée par 3 mécanismes majeurs : (i) différentes mutations sur plusieurs codons du gène *CYP51* codant pour la 14 $\alpha$  déméthylase ; (ii)- la surexpression de ce gène ; (iii)- réduction de l'accumulation du fongicide dans la cellule. La combinaison de ces mécanismes détermine le caractère polygénique de la résistance aux triazoles. Dans le cas de ces fongicides, il y a une variation continue de phénotypes qui se traduit par différents niveaux de résistance. Les traits quantitatifs de CI50 (concentration qui inhibe 50% de la germination) et de pourcentage d'inhibition à une concentration donnée (souvent 0.1 ppm) par rapport à un milieu sans fongicide sont des traits corrélés aux différents niveaux de résistance et permettent de déterminer les différents phénotypes.

(ii) les inhibiteurs quinones de la respiration mitochondriale (QoI), appartenant à la famille des strobilurines, dont le représentant est la trifloxystrobine (Tega). L'acquisition de la résistance est corrélée à la substitution de la glycine par l'alanine à la position 143 de la protéine mitochondriale du cytochrome b. Pour ce fongicide, la variation phénotypique de la résistance est discontinue et de type qualitatif. Ici, les outils moléculaires sont mis à contribution pour la détection de la mutation conférant la résistance. Cette technique est possible à partir de méthodes développées au Cirad (extraction d'ADN à partir de jeunes



lésions) et à Bayer Cropscience (détection de la mutation par pyroséquençage). Il est également envisageable de détecter la présence de la mutation par des tests de germination.

L'effet de la sélection est quantifié en conditions réelles de terrain, sur deux parcelles expérimentales de bananiers implantées sur des sites distants d'environ 6 km.

### Mise en place des dispositifs expérimentaux

La mesure exclusive de l'effet de sélection impose plusieurs contraintes :

- (i) la nécessité de s'affranchir de la migration : deux parcelles de bananiers d'un hectare ont été mises placées au milieu d'un peuplement continu dominé par le palmier à huile comprise entre Maleke (Site 1) et Mbondjo (Site 2) (photos 1 et 2). Dans cette zone, il y a une présence quasi inexistante de bananiers pour limiter les risques de contaminations par des flux migratoires ;
- (ii) la nécessité de démarrer l'expérimentation avec des faibles niveaux de résistance pour s'affranchir de la période d'apparition de mutations et de passer rapidement à la phase où toute augmentation de fréquence de résistance est proportionnelle à une augmentation du coefficient de sélection. Pour cela, des populations de faible niveau de résistance (10-15%) sont installées à partir de feuilles infectées par des souches résistantes;
- (iii) les fongicides sont appliqués en continu jusqu'à la stabilisation des fréquences de résistance ;
- (iv) les mesures régulières de la résistance sont effectuées dans les parcelles ;
- (v) estimer le coefficient de sélection;
- (vi) interruption des traitements;
- (vii) faire des mesures de la résistance pour observer une contre sélection.

Les parcelles de Maleke et de Mbondo ont été respectivement implantées depuis deux ans (avril – mai 2009). A Mbondo, la viabilisation du site a été très difficile et a nécessité la destruction des bananiers se trouvant dans les bas fonds qui jouxtent la parcelle.

### Installation des épidémies

A partir d'un point initial, l'application continue des traitements fongicides dans les parcelles va entraîner une augmentation graduelle de la fréquence de résistants. Pour les strobilurines, cette augmentation décrit une courbe logistique comportant une phase linéaire au cours de laquelle on estime le coefficient de sélection. Cette phase est précédée par une phase relativement longue au cours de laquelle il y a apparition de la mutation. Pour s'affranchir de cette période et rapidement passer à la phase d'estimation du coefficient, il est nécessaire de disposer d'un fond de résistance avant le démarrage de la pression de sélection.

Pour cela, cette activité consiste à installer des épidémies contrôlées à partir de feuilles infectées possédant un inoculum dont le niveau de résistance est connu et suffisamment abondant pour rapidement envahir les lieux. Les feuilles sont collectées des parcelles de plantain (inoculum abondant) voisines de parcelles commerciales, là où la résistance vis-à-vis des triazoles et strobilurines est établie. Ainsi, nous avons dans un premier temps évalué certains sites potentiels qui se caractérisent par (i) une faible fréquence de souches résistantes aux strobilurines ; (ii) de faibles niveaux de résistances aux triazoles. Plusieurs séries d'installation d'épidémies ont déjà eu lieu avec des feuilles provenant de parcelles de plantain de Mbome pour les triazoles et de Lala pour les strobilurines.

Le principe d'installation d'épidémies est d'attacher au moins une feuille nécrosée sur le pseudo-tronc de chaque bananier, la face supérieure tournée vers le haut (photo 3) tous les 3 à

4 bananiers. Après introduction des feuilles, on a constaté de très sévères infestations sur les bananiers des deux parcelles, ce qui montre bien l'efficacité de ces introductions (photo 4).



Photo 1 : parcelle de Mbonjo (Site 1)

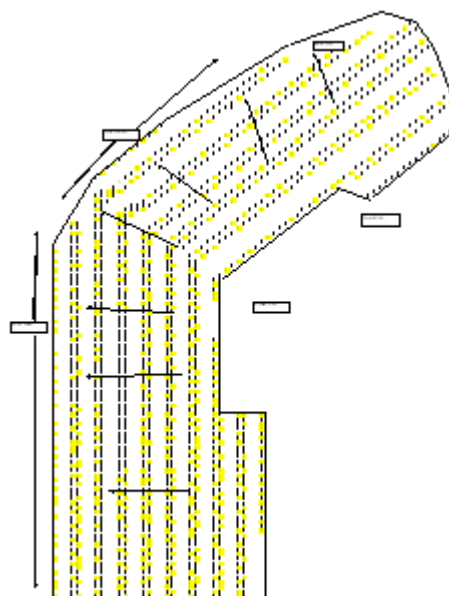


Figure 12 : Plan de la parcelle de Mbonjo



Photo 2 : planting de Maleke (Site 2)  
Maleke



Figure 13 : Plan de la parcelle de Maleke

- Sur la parcelle de Maleke 402 feuilles provenant de la parcelle de Mbome ont été introduites lors de la première installation (points jaunes sur la figure 13). Lors de la deuxième installation, de nouvelles feuilles ont été introduites, toujours en provenance de la parcelle de Mbome.
- Sur la parcelle de Mbonjo, 533 feuilles provenant de la parcelle de plantain jouxtant la plantation de Lala (figure 12)



Photo 3 : feuille infectée attachée sur un bananier



Photo 4 : infection d'un bananier porteur de feuilles infectées après 3 semaines

### Mesure initiale de la résistance

Les observations récentes sur les deux parcelles montrent qu'on retrouve des % d'inhibition de 52,5% pour les triazoles et 77,6% pour les strobilurines à Maleke. Ces niveaux de résistance dans les deux parcelles semblent élevés aussi bien pour les triazoles que pour les strobilurines. Toutefois, ces résultats préliminaires doivent être confirmés par des analyses moléculaires pour la résistance aux strobilurines et un phénotypage précis de la résistance aux triazoles. Dans le cas où de tels niveaux sont confirmés, il serait donc envisageable de procéder à une réinstallation d'épidémies avec des feuilles infectées provenant des zones non traitées, de façon à réduire à 10-15% les niveaux de résistance avant le démarrage des traitements fongicides.

### Application des traitements fongicides

Les fongicides Tilt et Tega sont respectivement appliqués sur les parcelles de Maleke et Mbonjo à un rythme d'une fois par semaine. La pression continue exercée par ces fongicides va entraîner une augmentation progressive de la fréquence de résistance, jusqu'à sa stabilisation. A partir de là, les traitements sont interrompus indéfiniment pour observer une éventuelle contre sélection.

### Estimation de coefficient de sélection

#### (i) Cas d'une résistance qualitative (les strobilurines) :

Ici, l'utilisation de marqueurs génétiques permet de déterminer les fréquences alléliques de souches résistantes et sensibles. Eventuellement, ces fréquences pourront être déterminées par des méthodes de phénotypages. L'évolution des fréquences alléliques au cours du temps décrit une courbe logistique dont la pente détermine le coefficient de sélection (figure 3).

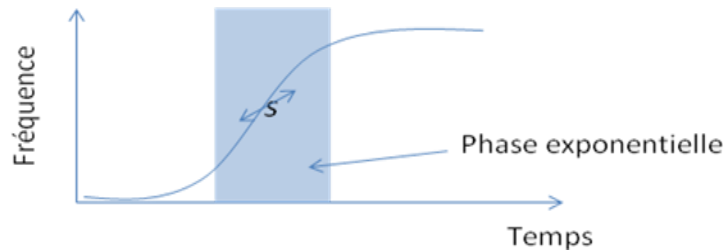


Figure 3 : courbe d'évolution des fréquences alléliques au cours du temps

Le coefficient de sélection  $s$ , peut ainsi être estimé à partir de la formule suivante utilisée par Milgroom :

$$s = \frac{\ln \left[ \frac{p(1-p_0)}{p_0(1-p)} \right]}{T}$$

Où  $p_0$  : fréquence initiale des individus résistants ;  $p$  : fréquence des individus résistants au temps  $T$

Le modèle sera appliqué pendant la phase linéaire au cours de laquelle l'augmentation de la fréquence est proportionnelle au coefficient de sélection.

#### (ii) Cas d'une résistance quantitative (les triazoles) :

Dans ce cas on va mesurer un trait quantitatif  $z$  qui est soit la CI50 (concentration qui inhibe 50% de la germination) ou un pourcentage d'inhibition de croissance à une concentration fixe de 0,1 ppm.

Kingsolver et Pfennig (2007) ont proposé la formule suivante pour estimer un gradient de sélection  $\beta$  pour un trait quantitatif dans le cas d'une sélection directionnelle.

$$\Delta \bar{z} = \beta Va$$

où  $\Delta \bar{z}$  est la différence de moyenne du trait en réponse à la sélection ;  $Va$  est la variance génétique additive du trait.

$Va = Vp - Ve$  où  $Vp$  : variance phénotypique totale et  $Ve$  la variance environnementale

→ déterminer  $Vp$  et  $Ve$ : L'analyse de la variance (ANOVA) du facteur isolat avec 2 répétitions nous permettra de déterminer d'une part la *variance phénotypique totale*  $Vp$  et la variance résiduelle observée entre les répétitions de mesure CI50 de chaque isolat sera associée à *Variance environnementale totale*  $Ve$ .

Avant le démarrage des traitements fongicides prévu en avril, l'un des préalables est de finaliser la mise au point sur la rationalisation de l'échantillonnage au champ.



#### 2.4.5. Activité spécifique 5 : Evaluer la compétitivité des souches résistantes par rapport aux souches sensibles

L'objectif est d'évaluer le coût associé à l'acquisition de la résistance. Cette partie du projet est en étroite ligne avec l'étude de la contre sélection au champ après interruption de la pression de sélection et permet de faire une analyse plus fine du coût de la résistance sur des traits spécifiques de la compétitivité du champignon. L'idée est d'évaluer la pathogénicité des souches résistantes comparativement aux souches sensibles dans un premier temps sur des traits d'agressivité spécifiques tels que : la germination, la sporulation, la durée d'incubation, la vitesse de croissance de symptômes, le nombre de lésions et la taille de lésions. Dans un second temps, la pathogénicité est évaluée sur la compétitivité des souches résistantes et présence de souches sensibles par des co-inoculations. Ces études sont réalisées en conditions contrôlées par des inoculations sur feuilles maintenues en survies. La démarche consiste à :

- (i) constituer une collection de souches résistantes et sensibles candidates pour les inoculations
- (ii) caractériser la collection de souches
- (iii) faire un choix de souches
- (iv) évaluer les traits d'agressivité et la compétitivité des souches résistantes et sensibles

##### (i) la collection de souches

- Les souches sensibles sont collectées à partir de conidies et ascospores isolées sur des bananiers du sous groupe Cavendish cultivé de façon extensive par les paysans et localisés proches des plantations industrielles afin de partager la micro-variabilité neutre entre les souches des deux compartiments traités et non traités.

- les critères de collecte des souches résistantes diffèrent en fonction du fongicide, pour les strobilurines, on recherche des souches potentiellement résistantes en observant des phénotypes, dont les génotypes sont par la suite déterminés par pyroséquençage. Pour les triazoles, on recherche des isolats qui présentent différents niveaux de résistance en observant d'abord un pourcentage d'inhibition de croissance à une concentration donnée. La détermination de phénotypes se fait par la suite en mesurant une CI50 à partir de laquelle on calcule un facteur de résistance (FR) (confère as1). La caractérisation de souches est fonction du FR sur une large gamme de plusieurs triazoles et des résistances croisées possibles. Tous les isolats et souches sont collectés à partir de conidies ou d'ascospores isolées en plantation industrielle traitée sur Cavendish.

Tous les souches et isolats sont conservés à -80°C dans du glycérol. L'état actuel de la collection montre un gros déficit en souches sensibles (tableau 2). Par ailleurs, ces souches ont été collectés sur plantain et non sur Cavendish.

fongicides	Nb isolat en collection	Nb souches phénotypées	Nb souches génotypées	Nb souches R	Nb souches S
Triazoles	200	0	0		
Strobilurines	211	22	130	34	74
Benzimidazoles	120	22	111	54	44
Témoin sensible	30	1	0		

##### (ii) la caractérisation des souches

Les méthodes utilisées pour la caractérisation sont fonction du fongicide. Pour les strobilurines le génotypage se fait par la détermination des fréquences alléliques au niveau moléculaire à l'aide de la technique de pyroséquençage. On extrait l'ADN à partir de mycelium d'un isolat. Par la suite on amplifie par PCR la portion du gène portant la mutation et les échantillons sont expédiés à BCS pour la détection par pyroséquençage. Cette technique est utilisée en routine chez BCS et repose sur le principe de détermination du profil de méthylation de la portion amplifiée du gène.

Pour les triazoles, la détermination du statut des souches se fait pour l'instant par phénotypage. Toutefois, des points de mutation sur le gène CYP51 ont été aujourd'hui clairement identifiés et des génotypages sont envisageables. Pour le phénotypage, on mesure une CI50 sur une gamme de plusieurs triazoles epoxyconazole (difénoconazole, propiconazole, tebuconazole, triadimenol, bitertanol, prochloraz, et triflumizole). Chaque fongicide est évalué sur une plusieurs concentration suivant une progression géométrique d'un facteur 5, allant de 0.00196 à 30 ppm. Pour chaque souche (r), le FR est calculé comme le rapport de la concentration qui inhibe 50% de la croissance mycelienne (CI50)<sub>r</sub>, sur la CI50 moyenne des souches sensibles, (CI50)<sub>s</sub> :  $FR(r) = (CI50)_r / (CI50)_s$ . La caractérisation de souches est fonction du FR sur une large gamme de plusieurs triazoles et des résistances croisées possibles.

Une première tentative avait permis de caractériser 144 souches à l'aide de la technique de mesure de CI50 par densité optique utilisé en routine à BCS chez *M. graminicola*. Cette technique utilise des outils entièrement robotisés et présente l'avantage de traiter un grand volume d'échantillons. Les incohérences dans les résultats entre répétitions de mesures de CI50 pour une même souche (tableau 3) montrent que des mis au point sont nécessaires avant le transfert de cette technique chez *M. fijiensis*.

Tableau 3 : vérification de la répétitivité des mesures de la CI50

Code de la souche	Répétition	CI50 epox	CI50 difé	CI50 prop	CI50 tebu	CI50 trial	CI50 Proc
TiR1	1	0,0171	0,0226	0,1431	0,0825	0,8727	0,0903
TiR1	2	2,9503	0,0225	0,1962	0,1794	1,0712	0,9954
TiR2	1	0,1130	0,1567	1,1796	1,0383	7,5103	0,6031
TiR2	2	2,0426	0,3469	1,9235	0,6954	9,8802	0,8734
TiR4	1	0,0495	0,0614	0,9044	0,3372	1,7870	0,2621
TiR4	2	5,3257	0,0338	0,1626	0,1238	1,5890	0,6347
TiR5	1	0,0117	0,0130	2,1092	0,1748	0,6206	0,1038
TiR5	2	7,1798	0,0304	0,1887	0,2002	2,8581	2,2548
TiR6	1	0,0285	0,0593	12,2646	0,3430	3,6869	0,2250
TRi6	2	-	-	-	-	-	-
TSi9	1	0,0322	0,0773	0,2400	0,2807	2,7456	0,2208
TSi9	2	0,0040	0,0424	1,0763	0,4203	5,4522	0,2668

### (iii) le choix des souches

Le critère de choix est d'obtenir des souches résistantes à un seul fongicides à la fois et sensibles à tous les fongicides pour les souches sensibles. Pour cela, toutes les souches sont caractérisées sur tous les différents groupes de fongicides dont les triazoles, les strobilurines et les benzimidazoles. Pour les triazoles, les souches candidates sont triées en fonction de différents niveaux de résistance. Pour les strobilurines et les benzimidazoles, la détermination des fréquences alléliques est réalisée par pyroséquençage respectivement des mutations

G143A sur le génome mitochondrial et sur le codon 198 du gène de la beta tubuline. A la fin on opère un trie en fonction des critères fixés.

*(iv) l'évaluation des traits d'agressivité*

L'agressivité du champignon est évalué sur les traits de la germination, la sporulation, la durée d'incubation, la vitesse de croissance de symptômes, le nombre de lésions et la taille de lésions. Après la production et le calibrage de l'inoculum, les inoculations sont réalisées sur des feuilles maintenues en survie. Par la suite, on observe et on quantifie : - la germination au microscope en calculant le taux de germination (nombre de conidie germés / nombre de conidie inoculées) ; - la sporulation au microscope optique en calculant le taux de sporulation (nombre de conidies produits / lésion) ; - la durée d'incubation qui est le temps écoulé entre l'inoculation et l'apparition de premiers symptômes de la maladie. Enfin on observe l'efficacité des infections au cours du développement du stade 1 à 4, on compte : - le nombre de lésions qui permet de calculer l'efficacité contaminatrice (nombre de conidies inoculées / nombre de lésions) ; - on suit l'évolution de la taille des lésions et on calcule la vitesse de croissance de lésions.

*(v) la compétitivité des souches résistantes et sensibles*

Des mélanges à différentes proportions de souches résistantes (SR) et sensibles (SS) sont composés comme suit : 90SR/10SS, 50SR/50SS et 10SR/90SS. Chaque combinaison est ensuite inoculée sur des feuilles maintenues en survie et on mesure les fréquences des différentes souches après le développement jusqu'au stade 4. L'ADN de chaque lésion est extrait par une technique mise au point au Cirad, et fréquence des différents génotypes est quantifié par la technique de PCR quantitative (Q-PCR). Ainsi on peut évaluer la variation de chaque combinaison initiale.